FACULTÉ DE MEDECINE DE PARIS

ANNEE 1962

N° 1079

THESE

POUR LE

DOCTORAT EN MEDECINE

(Diplôme d'Etat)

PAR

FOURNIER, PIERRE-JEAN

Né le 23 Avril 1930 à PARIS

Présentée et soutenue publiquement le

DIAGNOSTIC DES GASTROENTERITES INFANTILES À COLIBACILLES ENTEROPATHOGENES PAR IMMUNOFLUORESCENCE

PRESIDENT : Monsieur le Professeur JULIEN MARIE

Roger VEZIN - 48, rue de la Santé - PARIS

FACULTÉ DE MEDECINE DE PARIS

ANNEE 1962 N°

THESE

POUR LE

DOCTORAT EN MEDECINE

(Diplôme d'Etat)

PAR

FOURNIER, PIERRE-JEAN

Né le 23 Avril 1930 à PARIS

Présentée et soutenue publiquement le

BIBLIOTHÈQUE

DIAGNOSTIC DES GASTROENTERITES INFANTILES À COLIBACILLES ENTEROPATHOGENES PAR IMMUNOFLUORESCENCE

PRESIDENT : Monsieur le Professeur JULIEN MARIE

Roger VEZIN - 48, rue de la Santé - PARIS

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

1 - 2 - 1962

PROFESSEURS HONORAIRES :

MM. ALAJOUANINE (T.), AUBIN (A.), BENARD (H.), BULLIARD (H.), CADENAT (F.), CHABROL (E.), CHAMPY (C.), DEBRE (R.), FEY (B.), GASTINEL (P.), HALPHEN (E.), HAZARD (R.), HEUYER (G.), LANTUEJOUL (P.), LAROCHE (G.), LEVY-SOLAL (E.), LIAN (C.), MATHIEU (P.), MOCQUOT (P.), MONDOR (H.), MONOD (R.), MOREAU (R.), MOULONGUET (P.), OLIVIER (E.), PASTEUR VALLERY RADOT, PETIT-DUTAILLIS (D.), QUENU (J.), RICHET (C.), SENEQUE (J.), STROHL (A.), TANON (L.).

DOYEN . . . . . L. BINET
Membre de l'Institut

1er ASSESSEUR . . . . . Jean VERNE
2e ASSESSEUR . . . . . Gaston CORDIER

P R O F E S S E U R S

1° - CHAIRES DE SCIENCES FONDAMENTALES

a.- Professeurs titulaires :

	MM.
ANATOMIE	DELMAS (A.)
ANATOMIE PATHOLOGIQUE	DELARUE (J.)
ANESTHESIOLOGIE	BAUMANN (J.)
	JAYLE (M.F.)
BIOCHIMIE MEDICALE	SCHAPIRA (G.)
BIOLOGIE APPLIQUEE A L'EDUCATION PHYSIQUE & AUX SPORTS	CHAILLEY-BERT (P.)
BIOLOGIE MEDICALE	FAUVERT (R.)
CANCEROLOGIE MEDICALE ET SOCIALE	BERNARD (J.)
EMBRYOLOGIE	GIROUD (A.)
HISTOIRE DE LA MEDECINE & DE LA CHIRURGIE (Laribosière)	N ...
HISTOLOGIE	VERNE (J.)
HYGIENE ET MEDECINE PREVENTIVE	JOANNON (P.)
MEDECINE DU TRAVAIL	DESOILLE (H.)
MEDECINE LEGALE	PIEDELIEVRE (R.)
MICROBIOLOGIE (Bactériologie et Virologie)	FASQUELLE (R.)
PARASITOLOGIE	GALLIARD (H.)

	MM.
PATHOLOGIE CHIRURGICALE	HUGUIER (J.)
PATHOLOGIE EXOTIQUE	LAVIER (G.)
PATHOLOGIE EXPERIMENTALE ET COMPAREE	MERKLEN (F.P.)
PATHOLOGIE MEDICALE	MILLIEZ (P.)
PATHOLOGIE RESPIRATOIRE	TURIAF (J.)
PATHOLOGIE & THERAPEUTIQUE GENERALES	BOUDIN (G.)
PHARMACOLOGIE	CHEYMOL (J.)
PHYSIOLOGIE	BINET (L.)
	BARGETON (D.)
PHYSIOLOGIE & PATHOLOGIE OBSTETRICALE	LEPAGE (F.)
PHYSIQUE MEDICALE	DOGNON (A.)
	DJOURNO (A.)
RADIOLOGIE MEDICALE	DESGREZ (H.)
TECHNIQUE CHIRURGICALE & CHIRURGIE EXPERIMENTALE	N ...
THERAPEUTIQUE	CONTE (M.)

b.- Professeurs à titre personnel :

BIOCHIMIE MEDICALE	DESGREZ (P.)
	POLONOVSKI (J.)
BIOLOGIE MEDICALE	BOURLIERE (F.)
EMBRYOLOGIE	TUCHMANN (H.)
HYGIENE & MEDECINE PREVENTIVE	DEPARIS (M.)
PARASITOLOGIE	BRUMPT (L.C.)
PATHOLOGIE CHIRURGICALE	LAURENCE (G.)
PHARMACOLOGIE	LEVY (Melle J.)
PHYSIOLOGIE	PARROT (J.)
PHYSIQUE MEDICALE	KELLERSHOHN (L.)

2° - CHAIRES DE SCIENCES CLINIQUES

a.- Professeurs titulaires :

CLINIQUE CARCINOLOGIQUE CHIRURGICALE (Necker)		REDON (H.)
CLINIQUE CARDIOLOGIQUE (Broussais)		MOUQUIN (M.)
CLINIQUES CHIRURGICALES	Beaujon	LORTAT-JACOB (J.L.)
	Cochin	LEGER (L.)
	Hôtel-Dieu	PATEL (J.)
	Pitié	CORDIER (G.)
	Saint Antoine	GOSSET (J.)
	Salpêtrière	SICARD (A.)
	TENON	OLIVIER (Cl.)

MM.

CLINIQUE DE CHIRURGIE INFANTILE & ORTHOPEDIQUE		FEVRE (M.)
CLINIQUE CHIRURGICALE ORTHOPEDIQUE & REPARATRICE (Cochin)		MERLE d'AUBIGNE (R.)
CLINIQUE DE CHIRURGIE CARDIO-VASCULAIRE (Broussais)		GAUDART d'ALLAINES (F. de)
CLINIQUE DE CHIRURGIE PLEURO-PULMONAIRE (Laennec)		MATHEY (J.)
CLINIQUE ENDOCRINOLOGIQUE (Pitié)		DECOURT (J.)
CLINIQUE DE GENETIQUE MEDICALE (Enfants Malades)		LAMY (M.)
CLINIQUE GYNECOLOGIQUE (Broca)		FUNCK BRENTANO (P.)
CLINIQUE DES MALADIES CUTANEES & SYPHILITIQUES (Saint-Louis)		DEGOS (R.)
CLINIQUE DES MALADIES DES ENFANTS (Enfants Malades)		CATHALA (J.)
CLINIQUE DES MALADIES INFECTIEUSES (Claude Bernard)		MOLLARET (P.)
CLINIQUE DES MALADIES MENTALES ET DE L'ENCEPHALE (Sainte Anne)		DELAY (J.)
CLINIQUE DES MALADIES METABOLIQUES (Necker)		HAMBURGER (J.)
CLINIQUE DES MALADIES DU SANG (Broussais)		MARCHAL (G.)
CLINIQUE DES MALADIES DU SYSTEME NERVEUX (Salpêtrière)		CASTAIGNE (P.)
CLINIQUES MEDICALES	Boucicaut	LENEGRE (J.)
	Broussais	SOULIE (P.)
	Cochin	JUSTIN-BESANCON (L.)
	Cochin	BROUET (G.)
	Hôtel-Dieu	BARIETY (M.)
	Laribboisière	SEZE (S. de)
	Pitié	DREYFUS (G.)
	Saint-Antoine	KOURILSKY (R.)
CLINIQUE MEDICALE D'HYDROLOGIE THERAPEUTIQUE & CLIMATOLOGIE (Bichat)		DEBRAY (C.)
CLINIQUE MEDICALE PROPEDEUTIQUE (Broussais)		GENNES (L. de)
CLINIQUE MEDICO-SOCIALE DU DIABETE SUCRE & DES MALADIES DE LA NUTRITION (Hôtel-Dieu)		DEROT (M.)
CLINIQUE DE NEURO-CHIRURGIE (Pitié)		DAVID (M.)
CLINIQUE NEUROLOGIQUE (Salpêtrière)		GARCIN (R.)
CLINIQUES OBSTETRICALES	Baudelocque	LACOMME (M.)
	Foch (Suresnes)	MERGER (R.)
CLINIQUE OBSTETRICALE & GYNECOLOGIQUE (Port-Royal)		VARANGOT (J.)
CLINIQUE OPHTALMOLOGIQUE (Hôtel-Dieu)		RENARD (G.)
CLINIQUE OTO-RHINO-LARYNGOLOGIQUE (Laribboisière)		AUBRY (M.)
CLINIQUE DE PEDIATRIE & DE PUERICULTURE (Saint Vincent de Paul)		LELONG (M.)
CLINIQUE DE PEDIATRIE SOCIALE (Enfants Malades)		MARIE (J.)

MM.

CLINIQUE DE PNEUMO-PHTISIOLOGIE (Laennec)	BERNARD (E.)
CLINIQUE DE NEURO-PSYCHIATRIE INFANTILE (Salpêtrière)	MICHAUX (L.)
CLINIQUE DE RHUMATOLOGIE MEDICALE ET SOCIALE (Cochin)	COSTE (F.)
CLINIQUE STOMATOLOGIQUE (Pitié)	DECHAUME (M.)
CLINIQUE THERAPEUTIQUE CHIRURGICALE (Vaugirard)	ROUX (M.)
CLINIQUE THERAPEUTIQUE MEDICALE (Saint Antoine)	LEMAIRE (A.)
CLINIQUE TOXICOLOGIQUE	GAULTIER (M.)
CLINIQUE TRAUMATOLOGIQUE	PADOVANI (P.)
SEMEIOLOGIE MEDICALE	DOMART (A.)
SEMEIOLOGIE ET CLINIQUE CHIRURGICALE	POILLEUX (F.)
CLINIQUE UROLOGIQUE (Necker)	COUVELAIRE (R.)
HYGIENE & CLINIQUE DE LA PREMIERE ENFANCE	TURPIN (R.)

b.- Professeurs à titre personnel :

MEDECINE	BOUR (H.)
	LHERMITTE (F.)
	PEQUIGNOT (H.)

II.- PROFESSEURS SANS CHAIRE, PROFESSEURS AGREGES & MAITRES DE CONFERENCES - AGREGES

ANATOMIE	MM. CABROL (C.), COUINAUD (C.), GILLOT (C.), OLIVIER (G.)
ANATOMIE PATHOLOGIQUE	Melle GAUTHIER-VILLARS (P.) Pr. s. ch. MM. ABELANET (R.), BUSSER (F.), CHOMETTE (G.), GOUYGOU (Ch.) M. Conf., NEZELOFF (Ch.), ORCEL (L.), PAILLAS (J.)
ANESTHESIOLOGIE	KERN (E.), VOURC'H (G.)
BACTERIOLOGIE	BARBIER (P.), CHRISTOL (D.), LE MINOR (L.), TOURNIER (P.)
BIOCHIMIE MEDICALE	BAULIEU (Et.) M. Conf., BOURILLON (R.), CARTIER (P.) DREYFUS (J. Cl.), GONNARD (P.), KRUH (J.), JEROME (H.)
BIOLOGIE APPLIQUEE A L'EDUCATION PHYSIQUE & AUX SPORTS	M. PLAS (F.)
CARCINOLOGIE	MM. BOIRON (M.), DENOIX (P.), MATHE (G.), SELIGMANN (M.)

DERMATO-SYPHILIGRAPHIE	MM. CIVATTE (J.), DUPERRAT (B.)
ELECTRO-RADIOLOGIE	M. LEDOUX-LEBARD (G.)
HEMATOLOGIE	MM. BESSIS (M.), BILSKI-BASQUIER (G.), DAUSSET (J.) , DUHAMEL (G.)
HISTOLOGIE	MM. COUJARD (H.) Pr. s. ch., MAROIS (M.), RACADOT (J.)
HYDROLOGIE	MM. BESANCON (F.), CORNET (A.)
HYGIENE	MM. BOYER (J.) Pr. s. ch., BLANCHER (G.), Mme CORRE-HURST (L.) M. SAPIN-JALOUSTRE (H.)
MALADIES INFECTIEUSES	MM. BASTIN (R.), DUPONT (V.)
MEDECINE LEGALE	MM. DEROBERT (L.) Pr. s. ch. FOURNIER (E.), GUENIOT (M.) HADENGUE (A.)
MEDECINE DU TRAVAIL	M. ALBAHARY (C.)
NEURO-CHIRURGIE	M. PERTUISET (B.)
OBSTETRIQUE	MM. GRANJON (A.), HERVET (E.),LE LORIER (G.) LEVY (J.), MORIN (P.), MUSSET (R.), ROBEY (M.), SENEZE (J.), SUREAU (G.), THOYER-ROZAT (J.).
OPHTALMOLOGIE	MM. BREGEAT (P.), DUBOIS (A.), SARAUX(H.)
ORTHOPEDIE	MM. JUDET (R.), MEARY (R.), POSTEL (M.) RAMADIER (J.)
OTO-RHINO-LARYNGOLOGIE	MM. DEBAIN (J.), PIALOUX (P.),
PARASITOLOGIE	MM. GOLVAN (Y.), LAPIERRE (J.)
PATHOLOGIE CHIRURGICALE	MM. BARCAT (J.), BINET (J.P.), CAUCHOIX(J.), CERBONNET (G.), CHATELIN (C.L.), DUBOST (Ch.),DUBOST (Cl.),FAUREL (J.), FLABEAU (F.),GARBAY (M.), GARNIER (H.), de GAUDART d'ALLAINES (Cl.),GERMAIN (A.), LATASTE (J.), LEVEQUE (B.), LOYGUE (J.), MERCADIER (M.), NATALI (J.), PELLERIN(D.) PERROTIN (J.), ROBERT (H.), THOMERET (G.)
PATHOLOGIE EXOTIQUE	SCHNEIDER (J.)

PATHOLOGIE EXPERIMENTALE	MM. BENHAMOU (J.P.), BERTHAUX (P.), BOIVIN (P.), CROSNIER (J.), HARTMANN (L.) LOEPER (J.), MAURICE (J.), MIKOL (Cl.) RICHET (G.)
PATHOLOGIE MEDICALE	MM. AUSSANNAIRE (M.), BOUVIER (J.), BOUVRAIN (Y.), BRICAIRE (H.), BRISSAUD (H) BROCARD (H.), BUGE (A.), CATINAT (J.), CHRETIEN (J.), COBLENTZ (B.), CONTAMIN (F.) COURY (C.), ETIENNE (J.F.), FREZAL (J.), FRITEL (D.), HENNEQUET (A.), HIMBERT (E.), HOUSSET (E.), LAROCHE (Cl.), LESOBRE (R.), MACREZ (C.), MOREAU (L.), NICK (J.), ROYER (P.), TOURNEUR (R.), WOLFROMM (R.)
PEDIATRIE-PUERICULTURE	MM. JOSEPH (R.), LAFOURCADE (J.), LEPERCQ (G. MANDE (R.), MOZZICONACCI (P.), POLONOVSKI ROSSIER (A.), VIALATTE (J.) (C.)
PHARMACOLOGIE	MM. BOISSIER (J.), LECHAT (P.),
PHYSIOLOGIE	MM. BARRES (G.), DEJOURS (P.), DURAND (J.) GIRARD, M. Conf., HUGELIN (A.), SCHERRER (J.).
PHYSIQUE MEDICALE	MM. CHANTEUR (J.), GOUGEROT (L.) M. Conf. Pr. s. ch., GREMY (F.), M. Conf. MILHAUD (G.), PELLERIN (P.), ROUCAYROL (J. Cl.), TUBIANA (M.), M. Conf.
PNEUMO-PHTISIOLOGIE	MM. KREIS (B.), MEYER (A.), RENAULT (P.)
PSYCHIATRIE	M. PICHOT (P.)
PSYCHIATRIE INFANTILE	MM. DENIKER (P.), DUCHE (D.), FLAVIGNY (H) LAPRESLE (J.)
RHUMATOLOGIE	M. DELBARRE (F.)
STOMATOLOGIE	M. CERNEA (P.) Mme A. CHAPUT, M. Conf. Agr., M. GRELLET
THERAPEUTIQUE	MM. CHASSAGNE (P.), LAMOTTE (M.), MARCHE (J.)
UROLOGIE	MM. AUVERT (J.), MOULONGUET (A.), QUENU (L.)

III.- PROFESSEURS SANS CHAIRE ET AGREGES CHARGES DE COURS DE CLINIQUE ANNEXE (à titre permanent)

ANATOMIE	M. J. DEBEYRE
CLINIQUE CHIRURGICALE	MM. ABOULKER (P.) AMELINE (A.) Pr. s. ch., VERNE (J.M.)
CLINIQUE MEDICALE	MM. PERRAULT (M.), RAMBERT (P.) THIEFFRY (S.)
CLINIQUE OBSTETRICALE	MM. GRASSET (J.), MAYER (M.)
CLINIQUE OPHTALMOLOGIQUE	MM. DESVIGNES (P.), OFFRET (G.)
CLINIQUE OTO-RHINO-LARYNGOLOGIQUE	M. MADURO (R.)
CLINIQUE PEDIATRIQUE & PUERICULTURE	M. R. LAPLANE
CLINIQUE PSYCHIATRIQUE	M. H. BARUK
CLINIQUE UROLOGIQUE	M. R. KUSS

IV.- PROFESSEURS DETACHES DANS LES UNIVERSITES ETRANGERES

BACTERIOLOGIE	M. HAUDUROY (P.) Pr. s. ch.
PATHOLOGIE CHIRURGICALE	M. RUDLER (J.) Pr. s. ch.

V.- CHARGES DE COURS D'HYGIENE SCOLAIRE & UNIVERSITAIRE :

MM. BOLTANSKI (E.)
LAUNAY (C.)

Secrétaire Général de la Faculté	M. LENA (J.)
Secrétaire principale	Melle CHAINTREUIL (G.)
Conservateur en Chef de la Bibliothèque Conservateur du Musée d'Histoire de la Médecine	M.le Docteur HAHN
Conservateur	Melle DUMAITRE (P.)
Bibliothécaires	Mmes CONTET (J.), FORGET (F.) Melles LAURENT (H.) LE NOIR (G.) QUIEVREUX (E.)

Par délibération en date du 9 Décembre 1798, l'Ecole a arrêté que les opinions émises dans les dissertations qui lui seront présentées, doivent être considérées comme propres à leurs auteurs et qu'elle n'entend leur donner aucune approbation ni improbation.

A MES CHERS PARENTS,

En témoignage de ma reconnaissance
et de mon affection

A MA BELLE-MERE, Madame de VRIES,

Avec mes sentiments très affectueux

A MA FEMME,

dont l'aide me fut si précieuse,

Qu'elle trouve ici l'expression
de toute ma tendresse

A MA FILLE, BEATRICE,

A MES AMIS.

A Monsieur le Professeur JULIEN MARIE,

Professeur de Clinique de Pédiatrie Sociale

à la Faculté de Médecine de PARIS,

Qui nous a fait le grand honneur de bien vouloir

accepter la présidence de cette thèse,

EN HOMMAGE DE RESPECTUEUSE RECONNAISSANCE .

A Monsieur le Docteur E. E L I A C H A R,

Qui a bien voulu faciliter et encourager nos travaux,

Qu'il veuille bien trouver ici l'hommage de notre reconnaissance.

A mes Maîtres de l'Ecole de plein exercice de Médecine

de T O U R S,

et tout particulièrement à :

Monsieur le Professeur G. DESBUQUOIS,

Qui m'a révélé le premier l'intérêt

de la Pédiatrie.

A MES MAITRES D'EXTERNAT DES HOPITAUX DE PARIS :

Monsieur le Professeur LELONG,

Monsieur le Professeur TURPIN,

Monsieur le Professeur DEGOS,

Monsieur le Professeur BENARD,

Monsieur le Professeur VARANGOT,

Monsieur le Professeur Agrégé JOSEPH,

Monsieur le Docteur TARDIEU.

A MES MAITRES D'INTERNAT DES HOPITAUX
DE LA REGION DE PARIS,

Monsieur le Docteur PERROT,

Monsieur le Docteur LAJOUANINE,

Monsieur le Docteur VESLOT,

En hommage de respectueuse
gratitude

pour leur enseignement.

P L A N

Pages

INTRODUCTION 1

HISTORIQUE 3

A.- FLUOROCHROMES UTILISES. 5

B.- PRINCIPES DES DIFFERENTES METHODES UTILISABLES EN IMMUNO-FLUORESCENCE. 7

1.- Méthode directe 7
2.- Méthode indirecte 8
3.- Méthode de GOLDWASSER & SHEPARD 9
4.- Méthode d'inhibition de L'immuno-Fluorescence de GOLDMAN 9

C.- TRAVAUX PUBLIES D'IDENTIFICATION PAR IMMUNO-FLUORESCENCE DES ESCHERICHIA COLI ENTEROPATHOGENES. 10

1.- 1958 : WHITAKER 10
2.- 1960 : NELSON et WHITAKER 11
3.- 1961 : COHEN, AGE et STULBERG 12
4.- 1961 : THOMASON & Collaborateurs 16

MATERIEL ET METHODE 22

A.- SERUMS FLUORESCENTS 22

1.- Préparation des anticorps 22
a.- Immunisation animale. 22
Recueil des sérums. 22

b.- Fractionnement des Immuno-sérums. 22

2.- Conjugaison des gammaglobulines avec l'isothiocyanate de Fluoresceine 24

3.- Dilution des sérums fluorescents. 25

4.- Sérums fluorescents mixtes 27

5.- Spécificité. 27

Pages

B.- SELLES EXAMINEES 29

1.- Origine 29
2.- Mode de prélèvement 29
3.- Stockage 30

C.- MICROSCOPE UTILISE. 30

D.- METHODES D'EXAMEN 31

1.- Principes 31
2.- Préparation des lames 32
3.- Lecture des lames et quotation 33

RESULTATS 35

INTERPRETATION ET DISCUSSION 39

A.- SPECIFICITE 39

B.- SENSIBILITE 42

C.- COMPARAISON AVEC LES RESULTATS DES TRAVAUX ANTERIEURS. 46

1.- Corrélation 47
2.- Discordance par excès 47
3.- Discordance par défaut 49
4.- Conservation des selles 50
5.- Mode de prélèvement des selles 51
6.- Conservation des sérums fluorescents 52

METHODE INDIRECTE 53

CONCLUSIONS 57

BIBLIOGRAPHIE 60

INTRODUCTION

L'identification des colibacilles entéro pathogènes est l'une des applications les plus dignes d'intérêt de l'immunofluorescence, dans le domaine du diagnostic bactériologique.

Possédant déjà, par son principe, les qualités éprouvées de la méthode sérologique d'agglutination jusqu'à maintenant utilisée, l'originalité et l'intérêt de l'immunofluorescence est d'apporter, avec une très grande simplicité de manipulation, la rapidité du diagnostic bactériologique et, par conséquent, de permettre la promptitude de mise en oeuvre du traitement de l'enfant et de la prophylaxie de l'entourage.

Le gain de temps réalisé résulte de la possibilité d'effectuer l'identification des coli entéro-pathogènes dans les selles suspectes sans culture préalable.

Il est donc de l'ordre de 12 heures au minimum, et habituellement de 24 à 48 heures.

Si l'on sait que :

- d'une part ; les 10 sérotypes de Escherichia Coli actuellement reconnus comme certainement pathogènes sont responsables de presque toutes les redoutables épidémies de gastro-entérite infantile de collectivités de nourrissons et de prématurés ; sans qu'aucune particularité séméiologique permette d'affirmer leur responsabilité ;

- d'autre part : le séjour pendant quelques heures d'un enfant infecté parmi un groupe de nourrissons non immunisés suffit à déclencher l'épidémie,

on conçoit l'intérêt d'un diagnostic bactériologique qui permet, moins d'une heure après le prélèvement, de dépister le porteur de Coli entéro-pathogène.

D 'ailleurs, l'avantage de ce procédé n'est plus méconnu puisque, depuis 1958, date de la première publication par WHITAKER (réf. 42) de l'identification par immuno-fluorescence de Escherichia Coli $O127\ B_8$ dans les selles d'enfants d'une collectivité frappée par une épidémie de gastro-entérite infantile, les études se sont multipliées aux Etats-Unis confirmant expérimentalement les qualités présumées de la méthode et préludant très vraisemblablement à une large introduction de celle-ci dans la pratique courante.

Le principe de l'Immuno-fluorescence réside dans la mise en évidence du complexe immunologique antigène anticorps grâce à son marquage par une substance fluorescente (celle-ci étant, habituellement fixée sur l'anticorps).

HISTORIQUE

C'est COONS qui, le premier, en 1941, réalisa, dans un but diagnostique, le marquage d'un anticorps par une substance fluorescente (réf. 8) et c'est à lui que revient le mérite d'avoir suscité le développement et l'application de cette élégante méthode dans tous les domaines de l'immunologie.

a.- Déjà, la possibilité théorique du marquage d'un anticorps existait depuis que REINER en 1930 (réf. 30), puis EAGLE et coll. (réf. 15) avaient démontré la possibilité d'introduire un groupe chimique dans une molécule d'anticorps sans en détruire les propriétés spécifiques.

Ayant couplé un atoxyl diazotizé avec des anticorps de cheval anti pneumocoque I et II, REINER avait montré que le titre d'agglutination de la solution d'anticorps demeurait inchangé et qu'elle conservait un pouvoir protecteur pour la souris contaminée

b.- COONS avait eu un prédécesseur dans la tentative du marquage des complexes antigènes anticorps.

En effet, en 1934, MARRACK (réf. 26), ayant préparé un conjugué azobenzidine diazotizé de sérum anti-typhoïdique et anticholérique avait démontré que les organismes homologues étaient colorés en rose par ces anticorps chimiquement marqués.

c.- COONS et Coll. (réf. 9) reprenant ces travaux, avaient réalisé la coloration des pneumocoques avec des sérums de lapin antipneumocoque I et II azoconjugués. Mais la faiblesse de l'intensité de la coloration avait justifié l'abandon de cette méthode de marquage et suscité l'utilisation d'un autre traceur.

d.- Or, on savait, depuis les travaux de HOPKINS et WORMALL en 1933 (réf. 21) et de CREECH and JONES , en 1940, et 1941 (réf. 12, 13, 14) que des conjugués de plusieurs protéines avec des isocyanates d'hydrocarbure aromatiques s'étaient montrés très fortement fluorescents, c'est-à-dire devenaient une source d'un important rayonnement visible lorsqu'ils étaient soumis à une irradiation U.V.

COONS et Coll. (réf. 9) préparent un conjugué fluorescent de sérum de lapin anti-pneumocoque III en utilisant un isocyanate de fluorescéine . Ils démontrent :

- d'une part, que le dérivé d'anticorps β anthryl carbamide, formé conserve toutes ses propriétés immunologiques originales (agglutine les Pneumocoques III au même titre que le sérum original , fixe le complément, sensibilise passivement le cobaye au choc anaphylactique) ;
- et que, d'autre part, il rend visible en lumière U.V. le Pneumocoque type III électivement

Désormais, l'intérêt de la méthode est évident. Les travaux se succèdent pour explorer les innombrables possibilités d'application de l'immuno-fluorescence (300 références de travaux sont relatées par BEUTNER en 1961 (réf. 1).

Avant d'envisager son application dans le domaine du diagnostic bactériologique des colibacilles entéro-pathogènes, il faut passer rapidement en revue les perfectionnements apportés à la méthode depuis les premiers travaux cités de COONS et prendre connaissance :

a.- Des différents fluorochromes utilisés ;

b.- des différentes méthodes utilisables

A.- FLUOROCHROMES UTILISÉS

- COONS, dans ses premiers travaux (réf. 9) utilise la Fluorescéine qui, soumise à un rayonnement aux ultra-violets, émet une lumière vert-jaune dont l'intensité maxima se situe vers 550 µ (EMMART réf. 17).

- Plus tard, fut utilisée la Rhodamine qui émet une lumière rouge-orangé dont l'intensité maxima se situe vers 640 µ (UEHLEKE réf. 38).

Mais la préférence est donnée aux dérivés de Fluorescéine en raison de la plus grande sensibilité de l'oeil aux longueurs d'onde voisines de 550 µ et d'une moins grande fréquence dans la nature de l'auto-fluorescence verte.

- L'utilisation conjointe des deux fluorochromes, Fluorescéine et Rhodamine, sources d'une lumière de longueur d'onde bien distincte, est d'ailleurs possible, permettant une visualisation simultanée d'antigènes différents.

- Un 3ème fluorochrome qui semble très intéressant est le 3 hydroxypyren 5.8.10 trisulfonic acide utilisé par UEHLEKE (réf. 38).

La longueur d'onde de l'émission fluorescente maximale est analogue à celle de la fluorescéine (550) Mais l'intensité lumineuse donnée serait trois fois plus grande.

- Enfin, COONS, dans la revue générale de 1959 (réf. 11) note la possibilité d'utiliser la fluorescence bleue de l'anthracène.

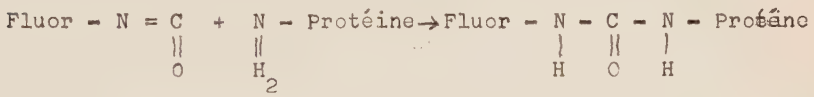
Seuls, les dérivés de fluorescéine sont actuellement utilisés pour identifier les Coli Entéro Pathogènes ; mais l'emploi simultané de Fluorescéine et de Rhodamine paraît être très souhaitable.

COMBINAISON CHIMIQUE ENTRE FLUOROCHROME et ANTICORPS :

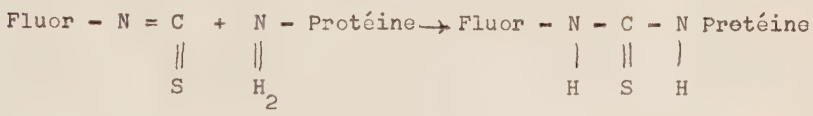
1.- Pour réaliser cette combinaison, COONS, initialement, utilisa un isocyanate de Fluorescéine préparé par réaction d'un groupe aminé de fluor avec le Phosgène

Fluor - N = C = O

L'isocyanate réagit avec le groupement aminé libre de la protéine anticorps pour former une union carbamide

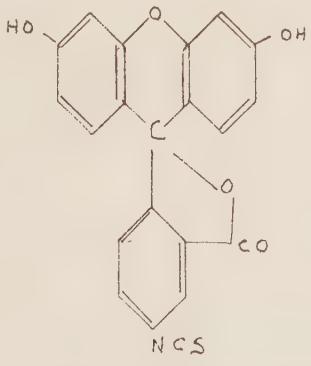


Plus tard, RIGGS et coll. (réf. 31) ont introduit un isothiocyanate de fluorescéine dont la réaction de combianison avec les protéines est voisine.



Ce dérivé est plus stable et serait, par surcroît, plus fluorescent que l'Isocyanate selon MARSHALL et Coll. (réf. 27).

C'est le dérivé actuellement couramment utilisé dont la formule développée selon NAIRN (réf. 28) est la suivante :



2.- Un conjugué Sulfonyl chloré de fluorescéine a également été employé (WEBER réf. 40) . La combinaison chimique se produit alors entre le groupe sulfonyl chloré et le radical aminé de la protéine.

$$\text{Fluor } SO_2\ Cl + NH_2\ \text{Protéine} \longrightarrow \text{Fluor } SO_2\ NH\ \text{Protéine}$$

Son intérêt résiderait , selon CHADWICK et Coll.(réf.4) dans la rapidité de conjugaison avec la protéine. Mais l'intensité de fluorescence ne serait que le 1/3 de celle obtenue avec l'isocyanate selon UEHLEKE (réf.38)

Ces deux types de conjugués isocyanate (isothiocyanate) et sulfonyl chloré peuvent également être obtenus avec la Rhodamine.

3.- Enfin, un troisième mode de liaison entre le fluorochrome et l'anticorps peut être réalisé en utilisant des dérivés diazotisés du Fluorochrome.

Cette conjugaison bien réalisée par LANDSTEINER (réf.25) donne lieu à de graves inconvénients :

. durée limitée de stabilité des sels diazonisés,

. fluorescence maximum à Ph3 et peu importante à Ph 7, signalée par BOREK et SILVERSTEIN (réf. 2) en utilisant le dérivé diazotisé d'aminorosamine.

Actuellement, et pour tous les travaux effectués sur le Coli entéro-pathogène, c'est l'Isothiocyanate de Fluorescéine qui est utilisé avec satisfaction par tous les auteurs.

B.- PRINCIPES DES DIFFERENTES METHODES UTILISABLES EN IMMUNOFLUORESCENCE

1.- Le procédé original de COONS (appelé méthode directe) consiste , on l'a vu, à mettre en présence l'antigène et l'anticorps homologue marqué par la fluorescéine.

La fixation de l'anticorps marqué sur l'antigène, en condensant sur ce dernier la fluorescéine diffuse de la préparation d'anticorps, visualise le complexe antigène anticorps.

2.- Méthode indirecte :

La présence du complexe antigène-anticorps est révélée indirectement par capture d'un anticorps fluorescent antigloguline de l'espèce animale à laquelle appartient l'anticorps spécifique non marqué utilisé.

C'est ainsi qu'un complexe antigène-anticorps dont l'anticorps est d'origine humaine peut être "révélé" par un sérum fluorescent de chèvre ou de lapin anti-humain.

Ce procédé est, dans son principe, analogue au test de coombs direct, utilisé pour la recherche de l'antigène Rh., mais ici l'anticorps antiglobuline humaine est fluorescent , permettant ainsi de visualiser directement le lieu où s'est fixé l'anticorps spécifique, c'est-à-dire la bactérie. Cette méthode , qui a également été décrite pour la première fois par COONS (réf. 41) en 1954 est encore appelée méthode "sandwich", l'antigène, la globuline anticorps et les anticorps antiglobulines fluorescents se superposant.

Les avantages de cette méthode indirecte sont importants et ils ont contribué à répandre la méthode de l'Immuno-Fluorescence. En effet, le procédé indirect :

a.- Permet d'utiliser une seule protéine marquée pour l'étude de tous les anticorps d'une espèce donnée.

Ainsi, dans les recherches d'antigènes microbiens au moyen de sérums de lapin, chacun spécifique de tel ou tel antigène microbien (que ce soit Escherichia Coli, Salmonella, Bordetella Pertussis ou même des amibes dysentériques), il suffit d'un seul sérum marqué : le sérum antiglobuline de lapin, pour mettre en évidence la combinaison antigène-anticorps.

b.- Il permet de mettre en évidence les anticorps dans les sérums de malades, en employant cette fois un sérum fluorescent antiglobuline humaine.

Par contre, un inconvénient de la méthode est la possibilité de la présence, dans les sérums antiglobuline d'origine animale, d'anticorps naturels correspondant à certains

espèces bactériennes et pouvant donner des réactions faussement positives.

Cette possibilité doit imposer la nécessité de toujours faire une réaction témoin ; bactérie étudiée plus sérum antiglobuline fluorescent ; ce témoin devant évidemment rester négatif.

Une variante de cette méthode indirecte peut être utilisée pour mettre en évidence des anticorps intra-cellulaires. Après fixation péri-cellulaire de l'antigène homologue, le complexe antigène-anticorps formé est révélé par capture d'un anticorps homologue fluorescent.

3.- GOLDWASSER et SHEPARD (réf. 20) utilisent un anticorps fluorescent anti-complément de cobaye. La réaction comporte la mise en présence successivement :

- dans un premier temps de :
  - l'antigène,,
  - l'anticorps homologue, préalablement privé de complément par chauffage à 56° pendant 30' ;
  - complément de cobaye.

- puis, dans un deuxième temps :
  - d'anticorps fluorescent anti-complément de cobaye.

Ce procédé également utilisé par KLEIN et BURKHOLDER (réf. 24) serait plus sensible que la méthode indirecte.

Bien qu'il ait le très grand avantage d'utiliser toujours le même sérum fluorescent, quel que soit le complexe antigène-anticorps capable de fixer le complément de cobaye, il a été encore peu étudié.

4.- Enfin, GOLDMAN (réf.19) utilise une méthode particulière d'inhibition d'Immuno-Fluorescence, utilisable pour mettre en évidence un anticorps.

Il met successivement en présence de l'antigène (Toxoplasma Condii), l'anticorps étudié , puis l'anticorps spécifique marqué.

Si l'antigène étudié est l'anti- corps spécifique, sa combinaison avec l'antigène inhibe la fixation ultérieure de l'anticorps spécifique marqué et donc la fluorescence du complexe antigène-anticorps.

Actuellement, tous les travaux effectués pour l'identification des Coli Entéro-pathogènes utilisent la méthode directe. Mais l'introduction de la méthode indirecte et peut-être même de la méthode de GOLDWASSER et SHEPARD pourrait accélérer la diffusion de la technique de l'Immuno-Fluorescence.

C.- TRAVAUX PUBLIÉS D'IDENTIFICATION PAR IMMUNOFLUORESCENCE DES ESCHERICHIA

1.- La première application de l'Immuno-Fluorescence pour l'identification dans les selles des Escherichia Coli entéro-pathogènes, est rapportée , en 1958, par WHITAKER (réf. 42)

Leur étude portait sur 128 échantillons de selles recueillies 3 ans auparavant , en 1954, au cours d'une épidémie de gastro-entérite infantile, due à Escherichia Coli 0127 B_8

Le résultat de l'examen de ces selles par les méthodes bactériologiques classiques avait déjà fait l'objet d'une publication en 1955, par STULBERG (réf.33).

Ces mêmes échantillons de selles qui avaient été conservées à -20°, furent, après décongélation et étalement, mises en présence d'antisérum OB de lapin pour 0127 B_8 , marqué par l'isothiocyanate de Fluorescéine, et examinées en lumière U.V.

En 1954, par les méthodes usuelles, sur 128 selles, 53 cultures positives à 0127 B_8 avaient été obtenues.

En 1957, la méthode d'Immuno-fluorescence confirmait la présence de Escherichia Coli 0127 B_8 dans ces mêmes 53 selles (alors que 29 de celles-ci altérées par 3 ans de conservation, restaient stériles en culture et ne permettaient plus, en 1957, de retrouver les Escherichia Coli).

De plus, 39 selles (sur les 75 restantes trouvées négatives par cultures) étaient trouvées par Immuno-fluorescence porteuses de Escherichia Coli 0127 B_8.

Or, ces 39 cas supplémentaires provenaient d'enfants ayant eu des cultures positives à 0127 B_8, ou bien avant, ou bien après cette culture négative et qui, de plus, recevaient au moment du prélèvement un traitement de Néomycine.

La totalité des échantillons de selles avaient simultanément été examinée avec un antisérum de lapin pour 0125 B_{15}, utilisé comme témoin ; aucun résultat positif n'avait été trouvé.

Les auteurs concluaient à un haut degré de spécificité de la méthode Immuno-Fluorescence ainsi qu'à une sensibilité biensupérieure à celle des méthodes d'identification usuelles ; la possibilité de mettre en évidence des organismes morts ou stériles était démontrée.

2.- En 1960, NELSON et WHITAKER (réf.29) utilisant 10 antisérums de lapin (correspondant aux 10 Escherichia Coli entéro-pathogènesconnus) marqués par Isothiocyanate de Fluorescéine et reportés en 3 pools, procèdent à l'examen de 365 échantillons coprologiques provenant d'enfants atteints de diarrhée, les uns hospitalisés (165), les autres vus en consultation externe (200).

Coproculture classique et Immuno-fluorescence étaient simultanément effectuées. Une discordance entre les résultats motivait un second examen avec chaque méthode.

- Il y eut concordance entre les méthodes classiques et l'Immuno-fluorescence dans 358 cas sur 365.

  . 323 résultats doublement négatifs,

  . 35 doublement positifs,

  . 15 fois l'Immuno-fluorescence permet de corriger un faux résultat initial obtenu par méthodes classiques, puisqu'un nouvel examen avec ces méthodes

donnait un résultat concordant avec l'Immuno-Fluorescence.

= 8 fois le résultat initial par méthodes classiques était faussement négatif ;

= 7 fois le résultat initial par méthodes classiques était faussement positif .

- Après re-examen, la discordance entre Immuno-Fluorescence et méthodes classiques persiste dans 7 cas.

- 5 fois, l'Immuno-Fluorescence était en défaut, donnant des résultats négatifs, alors que ceux obtenus par les méthodes classiques étaient positifs ; les auteurs attribuaient ce désaccord à la pauvreté de quelques-uns des frottis rectaux utilisés ;

- Dans 2 cas, la culture était en défaut, seule l'Immuno-Fluorescence étant positive. Les auteurs pensaient pouvoir attribuer ces deux résultats négatifs à un échec des méthodes de culture car ils ne mettaient pas en doute la spécificité des résultats positifs obtenus avec les antisérums fluorescents. Ils fondaient cette conviction sur les contrôles effectués avec chaque antisérum à l'égard de :

  . tous les types de Coli pathogènes,
  . de 99 coli non pathogènes,
  . de Salmonella, de Shigella et de nombreux bacilles Gr- et Cocci Gr+ et de Candida Albicans

"Les réactions croisées constatées étaient rares, de basse intensité, et pouvaient toujours être éliminées par l'absorption de l'antisérum fluorescent avec l'organisme approprié."

3.- En 1961, COHEN, PAGE, STULBERG (réf.7) utilisent 9 antisérums de lapin pour :

026 B_6 - 055 B_5 - 086 B_7 - 0111 B_4 - 0119 B_{14} - 0124 B_{17} - 0125 B_{15} - 0126 B_{16} - 0127 B_8

marqués par Isothiocyanate de fluorescéine.

Le titre d'agglutination O B s'échelonnait entre 1/320 et 1/2560.

Le degré de réaction croisée de chaque conjugué non dilué avec les huit Escherichia Coli hétérologues est d'abord recherché.

Pour cela, est utilisée pa formule de THOMASON (réf. 35) qui permet de chiffrer l'importance de la fluorescence obtenue (Staining Value)

$$\text{Staining Value} = \frac{\% \text{ des cellules colorées} \times \text{facteur de coloration} \times \text{intensité de coloration}}{10}$$

Les facteurs de coloration propres sont :

- 2,5 si coloration périphérique
- 1,5 " " diffuse,
- 0,5 " " mouchetée

Les degrés de l'intensité de coloration sont évalués de 1 à 4.

Ainsi, la valeur maximum de la"Staining Value" est

$$100 = \frac{100 \times 2,5 \times 4}{10}$$

Dans ces conditions, le tableau I, dans lequel sont consignés les résultats, montre qu'il n'existe de réaction croisée qu'entre :

- O 86 B_7 et O 127 B_8 qui correspondent à des relations sérologiques connues, entre ces deux sérotypes : EDWARDS and EWING (ref.16)
- et entre O126 B_{16} et 096 B_6 et O 119 B_{14}

Mais les "Staining Value" sont basses et dans tous les cas les réactions croisées sont éliminées par dilution des conjugués au 1/4 ou au 1/3.

TABLEAU I

Anticorps : Antigène : Colibacilles entéro-pathogènes

Antisérum marqué	26 B_6	55 B_5	86 B_7	111 B_4	119 B_{14}	124 B_{17}	125 B_{15}	126 B_{16}	127 B_8
26 B_6	100	12,5	0						
55 B_5	0	100	3,8	0					
86 B_7	0	6	100	0	0	1	0	0	50
111 B_4	0	1	0	100	0	0	0	4	0
119 B_{14}	0	0	3	0	100	7.5	0,5	0	1
124 B_{17}	0	5	0	0	0	100	0	0	2
125 B_{15}	1	0	1,5	0	0	0	100	0	0
126 B_{16}	25	0	2	0	15	0	0	100	0
127 B_8	0	1	50	1	20	0	0	12,5	100

TABLEAU II

Sérums fluorescents	Titres utilisés
O 26 B_6	10
O 55 B_5	80
O 111 B_4	40
O 127 B_8	80
O 86 B_7	40
O 119 B_{14}	80
O 124 B_{17}	20
O 125 B_{15}	10
O 126 B_{16}	10

Or, les titres de dilution des conjugués qui ont été retenus et qui correspondent à la plus grande dilution donnant avec les souches homologues une Staining Value de 75, sont très supérieurs au 1/10 (tableau II).

Dans ces conditions, la spécificité de chaque conjugué vis-à-vis des autres sérotypes d'Escherichia Coli pathogènes est parfaite.

Les auteurs examinèrent, par les méthodes classiques et l'Immuno-Fluorescence , 87 échantillons de selles .

- la corrélation fut obtenue dans 76 cas (41 positives, 35 négatives)
- le désaccord persista dans 11 cas dont :
  - . 6 positifs par Immuno-Fluoresdence, négatifs par autres méthodes ;
  - . 5 négatifs par Immuno-Fluorescence positifs par autres méthodes.

Il faut remarquer que, dans 8 cas, les résultats positifs par Immuno-Fluorescence n'ont été obtenus que grâce à un enrichissement en étuve pendant 4 ou 20 heures des prélèvements de selles.

Si l'on ne tient pas compte de ces 8 cas rattrapés par un artifice qui enlève à la méthode ses avantages essentiels, de rapidité et de simplicité, la corrélation est obtenue dans 72 cas et non 76 sur 87.

Et les 15 cas de discordance se répartissent ainsi :

- 4 positifs par Immuno-fluorescence, négatifs par autres méthodes ;
- 11 négatifs par Immuno-Fluorescence positifs par autres méthodes.

4.- En 1961, THOMASON et Coll. (réf. 36, 37, 5) publient, dans le Bulletin de l'Organisation Mondiale de la Santé, les résultats de la première étude très complète de la spécificité des anticorps fluorescents d'Escherichia Coli entéro-pathogènes, et de la première application diagnostique effective de la méthode.

Ils utilisent un antisérum de lapin O B pour 9 Escherichia Coli entéro-pathogènes, ceux-ci sont les mêmes que les 10 étudiés par NELSON & WHITAKER (réf.29) à l'exception de O124 B_{17} qui ne semble pas être un agent fréquemment pathogène.

L'agent fluorescent est toujours l'isothiocyanate de Fluorescéine.

Le titre de l'anticorps B est de 1/160.

Les dilutions des conjugués donnant une fluorescence cotée 2 (l'échelle allant de 0 à 4) s'échelonnent de 1/32 à 1/80.

Les deux mélanges utilisés pour l'approche diagnostique :

Pool 1 = 26 - 55 - 111 - 127

Pool 2 = 86 - 119 - 125 - 126 - 128

sont constitués de façon à ce que la dilution finale pour chaque sérotype soit de 1/20.

Dans ces conditions, les résultats de l'étude de la spécificité des conjugués utilisés furent lessuivants :

Les 2 mélanges et chacun des 9 antisérums OB conjugués furent testés avec :

a.- 145 sérotypes d'Escherichia Coli

Seulement 4 réactions croisées furent trouvées . Toutes 4 étaient prévisibles :

- 1 était dûe à une communauté d'antigène O conjugué 0127 B_8
avec sérotype 0127 ab B_{10}

- 1 était dûe à une communauté d'antigène B conjugué 086 B_7
avec sérotype 020 B_7

Les deux dernières réactions croisées entre :
conjugué O 127 B_8 et sérotype 097
et entre conjugué 086 B_7 et sérotype O 19 ab
étaient le reflet de similitudes antigéniques connues (EWING et coll. réf. 18).

Il faut insister sur le fait que ces 4 réactions croisées trouvées par immuno-fluorescence contrastent vivement avec les centaines de réactions croisées trouvées par agglutinations (EWING et KAMPELMACHER réf.18 et 22).

On remarque, en particulier :

. l'absence de réaction croisée entre chaque conjugué et les 8 escherichia Coli entéropathogènes hétérologues, les titres d'agglutination donnés par EWING (réf.18) laissant pourtant prévoir une réaction croisée entre O,86 B_7 et O 127 B_8 (titre d'agglutination 256 O)

. on ne constate pas non plus la réaction signalée par COHEN , STULBERG réf.7) entre conjugué O 126 B_{16} et Coli O 26 B_6 et O 119 B_{14}

. ce sont les antigènes O qui sont responsables de la majorité des réactions croisées, l'antigène B étant responsable de la seule réaction croisée entre conjugués O 86 B_7 et O 20 B_7

Cet accroissement considérable de spécificité est lié à la dilution des anti-sérums conjugués utilisés. Cette dilution ne diminue d'ailleurs pas la sensibilité de la méthode puisque la dilution maxima retenue est celle qui donne encore avec l'antigène homologue une vive fluorescence.

La spécificité des 9 sérums fluorescents fut également contrôlée par l'épreuve d'inhibition de fluorescence consistant à mettre en présence des antigènes, des anticorps homologues non marqués, puis à vérifier l'absence de fixation des anticorps marqués.

b.- Avec 12 sérotypes de Shigella :

aucune coloration croisée (les relations antigéniques existant avec les Escherichia Coli ne concernent pas les Escherichia Coli entéro-pathogènes).

c.- Parmi 12 sérotypes Providence :

un seul (O_6) est coloré par O 55 B_5, cette parenté avait été constatée par réaction d'agglutination.

d.- Parmi 12 Intermédiate et Coliforme :

aucune réaction croisée.

e.- Parmi 32 antigènes O différents de Citrobacter Freundi :

une seule réaction croisée entre conjugué O 128 B_{12} et citrobacter freundi O 26.

f.- Parmi 12 sérotypes O d'Arizona :

une coloration d'Arizona O 18 par conjugué O 127 B_8

g.- Parmi 28 sérotypes de Salmonella groupe O (1 à 45)

seulement 3 sérotypes étaient colorés.

Ils étaient d'ailleurs connus pour posséder des antigènes communs avec les Escherichia Coli homologues des anti-sérums colorants ; ce furent :

S O_{35} coloré par conjugué O 111 B_4
l'identité des antigènes O B avait été rapportée par VARELAC, en 1946 réf. 39).

S O (13,22) coloré par conjugué O 127 B_8
S O (1, 13, 23) coloré par conjugué O 127 B_8

L'identité antigénique avait été rapportée par KAMPELMACHER(réf. 22).

EN CONCLUSION :

La spécificité de la méthode d'Immuno-Fluorescence est, pour les auteurs, au moins équivalente à celle de la méthode d'agglutination.

Appliquant la méthode à l'examen de selles conservées par congélation, les auteurs trouvent sur 307 spécimens:

111 positives par immuno-fluorescence alors que

67 seulement l'avaient até lors des prélèvements par méthode d'agglutination.

Mais l'impossibilité de cultiver 124 des 307 spécimen altérés par la conservation, ne permet pas de vérifier les résultats d'agglutination initiaux.

Cet inconvénient disparaît dans l'étude de selles fraîches , menée à bien à Porto-Rico, parmi une population de 315 enfants, atteints de diarrhée et vivant dans un milieu d'endémie de gastro-entérite infantile.

Chaque prélèvement consistait en 5 frottis rectaux sur écouvillon.

- 1 servait à l'ensemencement de :
  - 2 milieux Mac CONKEY
  - 1 " au sang
  - 1 " de Sabouraud
  - 1 " Staphylocoque 110 Medium (DIFCO)
  - 1 bouillon d'enrichissement au selenite de Na pour culture sur milieu S S .
- 1 servait à l'étalement pour examen immédiat par immuno-fluorescence ;
- 3 étaient conservés :
  - 1 glacé,
  - les 2 autres à température ordinaire dans des tubes stériles fermés. Ils étaient utilisés 4 à 8 semaines plus tard.

De ce laborieux travail de comparaison entre les résultats des méthodes de culture d'agglutination et d'immuno-fluorescence, il ressort que, parmi 291 specimens, on trouve 106 résultats positifs par immuno-fluorescence.

Résultats par agglutination	Résultats par Immuno-fluorescence +	Résultats par Immuno-fluorescence -	Total
+	72	0	72
-	34	185	219
TOTAL	106	185	291

- Parmi les 106 résultats positifs par Immuno-fluorescence, on rencontre les 72 Escherichia Coli entéro-pathogènes isolés par culture, plus 34 spécimen positifs seulement par immuno-fluorescence .

  . Parmi ces derniers, 1 seul s'est révélé être en culture un citrobacter ayant des parentés antigéniques étroites avec O 127.

Pour expliquer les 33 résultats positifs en excès dans la méthode d'Immuno-fluorescence par rapport aux méthodes culturelles, les auteurs invoquent :

- l'action des bactériostatiques supprimant toute possibilité de culture, mais laissant à l'immuno-fluorescence la possibilité de révéler des bactéries mortes ou stériles ;

- des échecs de culture dont la réalité est démontrée par l'existence, sur 40 résultats initialement négatifs, de 5 cultures secondairement positives.

  L'échec de la culture pouvant provenir des difficultés d'isolement d'un Escherichia Coli entéro-pathogène au milieu d'une flore variée. Ce mélange étant un obstacle beaucoup moins important en Immuno-fluorescence.

- Enfin, est évoquée la possibilité d'une multiplication rapide des Escherichia Coli sur l'écouvillon au cours des 1 à 4 h. d'intervalle séparant le prélèvement de l'examen par immuno-fluorescence, alors que l'ensemencement des milieux de culture était effectué 5 minutes seulement après les prélèvements.

Alors que la confrontation précédente entre les résultats de l'Immuno-Fluorescence et les méthodes de culture suggérait une plus grande sensibilité de l'Immuno-Fluorescence, la comparaison des résultats d'identification par agglutination et Immuno-Fluorescence est en faveur d'une plus grande spécificité de l'Immuno-Fluorescence.

En effet, pour 118 résultats positifs par Immuno-fluorescence et agglutination, on relève :

- 4 résultats faussement positifs par fluorescence, et
- 24 résultats faussement positifs par agglutination.

Cette spécificité est confirmée par les résultats des examens des spécimens provenant de 75 témoins :

- 50 adultes dont 25 atteints de diarrhée ne donnent aucune immuno-fluorescence positive ;
- 25 enfants non diarrhéiques donnent un résultat positif par immuno-fluorescence, ce qui ne dépasse pas le proportion de 4 % de porteurs de germes citée comme normale par les auteurs.

MATERIEL ET METHODE

A.- SERUMS FLUORESCENTS

1.- PRÉPARATION DES ANTICORPS

a.- IMMUNISATION ANIMALE - RECUEIL DES SERUMS :

Les souches-types d'Eschérichia Coli ont été cultivées sur bouillon.

- après incubation de 8 h. au bain-marie à 37°, ceux-ci ont été additionnés de 0,5 cm3 % de formol du commerce à 30 %.

- après un séjour de 24 h. à l'étuve à 37°, un contrôle de stérilité est effectué en ensemençant un tube de bouillon et un tube de gélose ordinaire.

- cette suspension est injectée par voie intraveineuse à des lapins aux doses suivantes, espacées de 4 jours :

0,5 cm3 - 1 - 2 - 4 - 6 cm3

- les animaux sont saignés à blanc à la carotide 9 à 10 jours après la dernière injection.

- après coagulation du sang, le sérum est recueilli stérilement. les titres d'agglutinines moyens sont :

O 1/3.200

B 1/800

b.- FRACTIONNEMENT DES IMMUN SERUMS :

Celui-ci s'effectue à 0°, en glace fondante par le sulfate d'ammonium à demi-saturation.

- un volume de sérum,
- un volume d'eau physiologique,
- deux volumes de sulfate d'ammonium en solution aqueuse saturée, ajustée à Ph 7 au moyen de soude, ajoutée goutte à goutte.

Le mélange sérum plus eau physiologique est versé dans un bécher et celui-ci est placé dans un cristallisoir contenant de la glace. Le tout est déposé sur un agitateur magnétique. La solution de sulfate d'ammonium préalablement refroidie à 0° est ajoutée goutte à goutte au sérum dilué en agitant le mélange.

L'agitation est poursuivie pendant 20' après que les deux volumes de sulfate de NH_4 ont été ajoutés.

Une centrifugation à froid à 3.000 t/m pendant 15 minutes permet de séparer le précipité. Celui-ci est lavé deux fois au moyen de sulfate d'ammonium à demi-saturation et ensuite dissous dans l'eau physiologique , tamponné à Ph 7,1.

Cette solution est dialysée contre de l'eau physiologique jusqu'à ce que l'eau dialysée ne contienne plus de sulfate d'ammonium, c'est-à-dire lorsque l'addition d'une goutte de Cl_2 Ba acidifié par H Cl ne provoque plus de précipité.

c.- DOSAGE D'AZOTE.

La quantité d'azote de cette solution de globuline est titrée par la méthode du biuret. On en déduit la quantité pondérale de Protéines.

2.- CONJUGAISON DES GLOBULINES AVEC L'ISOTHIOCYANATE DE FLUORESCEINE

La quantité d'Isothiocyanate de Fluorescéine doit être le 1/20 de la quantité en poids de protéines.

Dans un bécher placé dans un cristallisoir, contenant de la glace fondante, on mélange :

- tampon carbonate (1)	Ph 9-9,5	15 volumes
- eau physiologique	qs	100 "
- solution de protéines	20 parties en poids	
- fluorescéine	1 "	"

On vérifie que le Ph est entre 9 et 9,5 et éventuellement on l'ajuste au moyen d'H Cl ou de soude dilués.

Le mélange est assuré par agitation magnétique et la fluorescéine ajoutée petit à petit.

Ce mélange est maintenu en agitation pendant 24 h. dans une chambre froide à 4°.

Cette solution est ensuite placée dans un tube de cellophane et dialysée , toujours à 4°, contre un tampon phosphate à Ph 7.

- Tampon Phosphate :

Na Cl	80 g.
PO_4 Na H_2	13,8 g.
Na OH (40 %)	7 ml.
eau distillée	10 l.

Vérifier que le Ph est entre 7 et 7,1

---

(1) - Tampon carbonate :

CO_3 Na_2	19,25 g/250 ml	mélanger 8 volumes de bicarbonate plus 1 volume de carbonate.
CO_3 Na H	10,50 g/250 ml	

Ce tampon est renouvelé 2 fois par jour jusqu'à ce que l'eau de dialyse ne soit plus teintée par la fluorescéine. Cette dialyse dure 5 jours environ. A ce moment, il y a souvent un léger précipité qui s'est formé dans le fond du tube de dialyse. La solution est centrifugée pendant 20' à 3.000 t/m le surnageant recueilli ; additionné de mercthiolate à la concentration terminale de 1/10.000 , réparti dans de petits tubes stériles bouchés au caoutchouc, ceux-ci sont étiquetés et placés dans une sorbetière à -20°.

Nous avons ainsi préparé des globulines marquées des 9 sérotypes d'Escherichia Coli entéro-pathogènes, rencontrés en France.

3.- Dilution des Sérums Fluorescents

Les sérums fluorescents ainsi obtenus contiennent un excès d'anticorps marqués. Il convient de rechercher la plus grande dilution utilisable. Cette dilution se propose : une épargne de sérum pur en même temps que la réduction de la fluorescence parasite qui est liée à l'excès d'anticopps marqués diffus ou fixés sur les débris alimentaires présents dans les selles.

De chacun des 9 sérums conjugués purs , il a été préparé 6 dilutions allant du 1/10 au 1/320 dans de l'eau physiologique tamponnée à Ph 7.

Chacune des 6 dilutions de chacun des 9 sérums conjugués a été testée avec l'antigène correspondant, c'est-à-dire la préparation de coli entéro-pathogène homologue.

Pour chacun des 9 sérums conjugués, a été retenue la plus grande dilution conférant encore une fluorescence de 3 croix aux bactéries (la préparation des lames, la quotation de fluorescence sont celles décrites au chapitre "Méthodes d'examen" ...).

Cette dilution utilisable s'est avérée être très importante, 1/40 au minimum, 1/160 au maximum. Les dilutions retenues ont été les suivantes :

0 26 B_6	1/160	0 125 B_{15}	1/80	0 119 B_{14}	1/40
0 111 B_4	1/40	0 126 B_{16}	1/80	0 86 B_7	1/160
0 55 B_5	1/80	0 128 B_{12}	1/80	0 127 B_8	1/80

Le tableau n° 4 résume les résultats de ces travaux préliminaires

TABLEAU N° IV

	1/10	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320
0 26 B_6	++++	++++	+++	+++	[+++]	0
0 111 B_4	++++	++++	[+++]	++	++	0
0 55 B_5	++++	++++	+++	[+++]	+	+
0 125 B_{15}	++++	++++	+++	[+++]	++	+
0 126 B_{14}	++++	++++	+++	[+++]	++	+
0 128 B_{12}	++++	++++	+++	[+++]	+	0
0119 B_{14}	++++	++++	[++]	+	+	0
0 86 B_7	++++	++++	+++	+++	[+++]	++
0 127 B_8	++++	++++	+++	[+++]	+	0

4.- SÉRUM FLUORESCENTS MIXTES

Pour, ultérieurement, accélérer l'identification des Coli entéro-pathogènes, on a préparé des mélanges de sérums conjugués.

1 mélange des 9 sérums conjugués,

3 mélanges de chacun : 3 sérums conjugués.

La répartition des sérums conjugués dans ces trois mélanges a été celle déjà choisie pour les mélanges d'anti-sérums utilisés pour la séroagglutination sur lame (préparation de l'Institut Pasteur), c'est-à-dire :

- Mélange I : 26 - 111 - 55
- Mélange II : 125 - 126 - 128
- Mélange III : 119 - 86 - 127

Dans ces mélanges, pour chaque sérum conjugué, la dilution optimale précitée a été respectée.

5.- CONSERVATION DE SÉRUM CONJUGUÉS

En attendant leur utilisation, tous les sérums conjugués purs et dilués, simples et mixtes, sont conservés en congélateur à -20°.

6.- SPÉCIFICITÉ

Chacun des 9 sérums fluorescents, chacun des trois mélanges trivalents et le mélange nonavalent ainsi obtenus, ont été testés avec les 9 souches des Escherichia Coli entéro-pathogènes.

La fluorescence obtenue a été, dans tous les cas, celle attendue sans aucune réaction croisée. C'est-à-dire :

- Le sérum nonavalent a donné une forte fluorescence (trois croix) avec les 9 souches utilisées ;

- Chacun des trois sérums trivalents a donné une forte fluorescence avec les trois souches homologues et n'a donné aucune fluorescence avec les 6 souches hétérologues ;

- chacun des 9 sérums monovalents a donné une forte fluorescence avec la souche homologue, sans rendre fluorescente aucune des 8 autres souches (voir tableau n° 5)

TABLEAU N° V

Souches de Escherichia Coli

Sérums fluorescents	26 B_6	111 B_4	55 B_5	125 B_{15}	126 B_{16}	128 B_{12}	119 B_{14}	87 B_7
26 B_6	+++	0	0	0	0	0	0	0
111 B_4	0	+++	0	0	0	0	0	0
55 B_5	0	0	+++	0	0	0	0	0
125 B_{15}	0	0	0	+++	0	0	0	0
126 B_{16}	0	0	0	0	+++	0	0	0
128 B_{12}	0	0	0	0	0	+++	0	0
119 B_{14}	0	0	0	0	0	0	+++	0
87 B_7	0	0	0	0	0	0	0	+++
127 B_8	0	0	0	0	0	0	0	0

B.- EXAMEN DES SELLES

1.- ORIGINE

Les échantillons de selles examinées proviennent du Service de Pédiatrie d'un Hôpital de la Région de Paris.

Pendant 4 mois (de février à mai 1961) des prélèvements de selles furent faits à tous les nourrissons diarrhéiques de moins de 1 an , soit dès leur entrée dans le service, soit dès l'apparition de la diarrhée si celle-ci survenait au cours de l'hospitalisation.

Ce prélèvement était renouvelé si les coprocultures standard avaient révélé la présence de Escherichia Coli entéropathogène par agglutination sur lame.

Dans ce cas, l'enfant recevait, en plus du traitement diététique habituel comportant : soupe de carotte, caroube, ou pectine , des antibiotiques entérophiles - (colimycine presque toujours, à des doses voisines de 200.000 u/kg)

Ainsi furent recueillis 224 échantillons de selles provenant toutes d'enfants étant ou ayant été atteints de diarrhée.

2.- MODE DE PRÉLÈVEMENT

Chaque échantillon de selle recueilli (après émission spontanée) était divisé en 2 parties :

- la première : transmise au laboratoire de l'hôpital était utilisée pour les coprocultures standard sur milieu S S et Drigalski.

  Les souches de bactéries identifiées comme Escherichia Coli entéro-pathogène par agglutination sur lame étaient adressées au Service des entérobactéries de l'Institut Pasteur de Paris où un contrôle, avec détermination du titre d'agglutination en tube était effectué.

- la seconde (quelques grammes de selles que nous devions examiner ultérieurement) était introduite dans un tube de verre. Celui-ci fermé par un bouchon de caoutchouc était conservé.

3.- STOCKAGE

Après un séjour en réfrigérateur à 4° pendant une semaine environ, les tubes de selles étaient envoyés à l'Institut Pasteur où ils étaient placés dans un congélateur à -20° jusqu'à leur utilisation , c'est-à-dire pendant une durée de 2 à 8 mois.

C.- MICROSCOPE UTILISÉ

Nous avons utilisé, pour la totalité des examens de ce travail, un Microscope ZEISS W L comportant :

a.- Une source de lumière Ultra-violette fournie par une lampe à vapeur de mercure, à haute pression, en quartz H B O-200 Osram de 200 watts.

b.- Entre cette source et le condensateur, étaient disposés successivement :

- un filtre anticalorique,
- un filtre dit d'excitation destiné à éliminer les rayonnements de longueur d'onde visible.

Nous avons utilisé le filtre Ultra-Violet U G 5, mais nous disposions également du filtre U.V.U G 2 et d'un filtre bleu B G 12 de 3 mm.

c.- Un ultra-condensateur à fond noir d'ouverture : 1,4 ;

d.- Deux objectifs à immersion et à diaphragme de grossissement x 40 et x 100.

e.- Deux filtres d'arrêt montés au-dessous des oculaires destinés à éliminer les rayons Ultra-violets en laissant passer les radiations visibles jaune-vert (émises par fluorescence) filtre rouge -65 couplé avec un filtre 47

f.- les 2 oculaires de grossissement x10.

D.- METHODE D'EXAMEN

1.- PRINCIPES

Chaque échantillon stocké est examiné selon la méthode d'Immuno-Fluorescence;

Si le résultat diffère de celui initialement trouvé par la méthode d'agglutination, une culture de contrôle est effectuée au laboratoire des Entéro-Bactéries de l'Institut Pasteur, suivi d'agglutination sur lame et si celle-ci est positive, d 'agglutination en tube.

L'examen par la méthode d'Immuno-Fluorescence comporte, pour chaque selle, 3 temps successifs :

- le premier : de DEPISTAGE, consiste à rechercher la fluorescence des bactéries induite par le sérum nonavalent Si elle a été trouvée :

- dans un deuxième temps : d'ORIENTATION, la même selle est examinée avec chacun des 3 sérums trivalents ; on détermine ainsi celui des 3 sérums responsable de la fluorescence ;

- enfin, dans un dernier temps : DIAGNOSTIC. L'examen avec chacun des 3 sérums nonavalent composant le sérum trivalent qui a provoqué la fluorescence bactérienne, permet de déterminer le sérum responsable de la fluorescence au cours de ces 3 étapes .

Pour chaque échantillon de selle, le nombre de préparations nécessaires est de :

- 1 au minimum s'il n' y a pas de bactérie fluorescente avec le sérum nonavalent,
- 13 au maximum dans le cas très improbable de la présence simultanée de 3 coli entéro-pathogènes appartenant à chacun des 3 mélanges de sérum trivalents.

En pratique, lorsque le résultat est positif avec le sérum nonavalent, 6 préparations suffisent. Soit 7 en tout.

2.- PRÉPARATION DES LAMES

Après décongélation des selles par un séjour de 30 à 60' des tubes qui les contiennent à la température du laboratoire, la préparation des lames comporte une succession de manipulations simples, réparties en deux temps (étalement et coloration des selles) qui peuvent éventuellement être effectués à plusieurs heures ou même plusieurs jours d'intervalle.

1.- PREPARATION DES ETALEMENTS DE SELLES .

Elle comprend :

- mise en suspension des selles dont les fragments sont dilués dans 3 à 5 fois leur volume de sérum physiologique (solution de Cl Na à 9°/$_{oo}$), puis agités pendant quelques secondes dans le tube de verre qui les contient.

- étalement proprement dit a vec une anse de platine sur le nombre de lames de verre désiré (7 en principe) ;

- séchage spontané à la température du laboratoire pendant 5 minutes environ ;

- fixation à l'alcool absolu.

2.-"COLORATION' DES LAMES AVEC LE SERUM FLUORESCENT :

- 2 à 3 gouttes du sérum fluorescent choisi sont déposées avec une pipette Pasteur sur la préparation de façon à la recouvrir.

  Après 20 minutes de contact, la lame étant maintenue rigoureusement horizontale dans un bac couvert et contenant du coton humide pour éviter une évaporation excessive.

- on lave par écoulement doux de sérum physiologique tamponné (Ph 7) froid (4°) sur la lame, puis celle-ci est déposée dans un bac rempli du même sérum. elle y séjourne 10 min.

- enfin, la lame est épongée avec une compresse, autour de l'étalement et recouverte d'une lamelle sous une goutte de glycérine tamponnée.

La totalité des manipulations depuis la dilution des selles jusqu'au montage sous glycérine requiert 45 minutes environ pour une série de 7 lames. La préparation habituelle simultanée de plusieurs séries correspondant à plusieurs selles n'allonge pas sensiblement le temps de préparation.

3.- LECTURE DES LAMES ET QUOTATION

L'examen microscopique des préparations est , dans la grande majorité des cas , très rapide.

Le temps initial de l'examen est utilsment effectué avec un objectif à immersion e t à diaphragme donnant un grossissement de 40 d (x oculaire 10, soit de 400 terminal) . Il permet une mise au point rapide et une recherche facile et prompte des plages de la préparation qui contiennent la plus grande densité d'éléments fluorescents suspects. A ce grossissement, les corps bactériens fluorescents sont déjà caractéristiques pour un observateur quelque peu entraîné ; ils ponctuent la préparation d'éléments de la grosseur d'une tête d'épingle dont la luminosité est nettement plus vive à la périphérie, respectant un centre ponctiforme plus sombre.

La mise au point avec l'objectif donnant un grossissement de 100 d (x 10 = 1000) permet une confirmation habituellement facile et quasi-immédiate.

Les bactéries isolées ou en amas apparaissent avec leur morphologie ovalaire caractéristique , cerclée par la ligne bordante lumineuse que crée la fixation périphérique des anticorps fluorescents.

La plus ou moins vive intensité lumineuse des corps bactériens conduit à la nécessité d'une quotation de la fluorescence;

Celle-ci a été simplement graduée de une à quatre croix :

4	++++	fluorescence	très vive
3	+++	"	vive à maximum périphérique
2	++	"	modérée avec ligne bordante encore nette ;
1	+	"	faible homogène.

Tous les résultats considérés comme positifs correspondent à une fluorescence supérieure ou égale à 2 croix. Cette intensité lumineuse, témoin d'une déjà forte concentration des anticorps fluorescents, jointe à la morphologie du corps bactérien, permet d'affirmer la présence d'Escherichia Coli entéro-pathogène avec une très grande probabilité.

RESULTATS

224 échantillons de selles ont été examinés , les résultats sont consignés dans le tableau n° 6.

TABLEAU N° VI

		Résultats d'Immuno-Fluorescence		TOTAL
		+	-	
Résultats d'agglutination	+	56	3	59
	-	16	149	165
TOTAL		72	152	224

- Il y eut corrélation entre les résultats de l'agglutination et l'Immuno-Fluorescence 205 fois concernant :

  . 149 résultats doublement négatifs (Immuno-Fluoresc. - Agglutination -)

  . 56 résultats doublement positifs (Immuno-fluoresc. + Agglutination +)

- Il y eut discordance : 19 fois

  ; 16 fois il s'agissait d'une discordance par excès de résultat positif par Immuno-Fluorescence ;

  . 3 fois le résultat positif par agglutination a été négatif par Immuno-Fluorescence.

72 fois, l'Immuno-Fluorescence fut positive et identifia :

36/0 127 B_8 15/0 55 B_5 11/ 0 111 B_4

8/ 0125 B_{55} 2/0 86 B_7 2 0/026 B_6 et

2/0 119 B_{14}

Ces 72 résultats positifs par Immuno-Fluorescence comprenaient et confirmaient 56 résultats positifs par agglutination, soit tous les résultats positifs par agglutination, moins trois (un 127 B_8 (selle 11) ; un 111 B_4 lysotype SEVRES (selle 33)

un 55 B_5 lysotype Weiler (selle 50)

auxquels s'ajoutent 16 cas négatifs par agglutination.

Ces 16 cas privilégiés positifs seulement par Immuno-Fluorescence correspondent à l'identification par Immuno-Fluorescence :

. 13 fois d'un Coli Entéro-pathogène soit 3 0127 B_8

3 0125 B_{15}

4 0 55 B_5

1 0 26 B_6

1 0119 B_{14}

1 0 86 B_7

. 3 fois simultanément 2 Coli Entéro-pathogènes

= 2 fois association de 125 B_{15} avec 55 B_5

= 1 fois association de 111 B_4 avec 55 B_5

Parmi ces 16 cas trouvés négatifs par agglutination :

. 9 fois aucune agglutination sur lame ne fut obtenue,

. 7 fois il y avait au contraire agglutination avec tous les sérums-test (souche dite R).

Dans 7 cas, la vérification de la négativité de l'agglutination put être faite grâce à une seconde culture .

Dans les 9 autres cas, les cultures restant stériles, la vérification ne fut pas possible.

Pour ces 16 cas, les dossiers d'hospitalisation révélait :

- 9 fois que le même Escherichia Coli entéro-pathogène avait été isolé par culture et agglutination dans les selles de l'enfant avant ou après l'examen en cause et parmi ces 9 cas, 4 fois l'Escharichia Coli entéro-pathogène est isolé chez des enfants soumis, depuis plus de 5 jours, à un traitement de sulfate de Colis - tine per os ;

- 4 fois le Escherichia Coli entéro-pathogène ne fut pas isolé des selles de l'enfant, mais ceux-ci recevaient, lors du prélèvement de celle, du sulfate de Colistine per os, à une dose égale ou supérieure à 100.000 u/kg/24 h. depuis plusieurs jours.

- enfin, 3 fois, on ne relevait ni traitement antibiotique concomitant, ni isolement d'Escherichia Coli entéro-pathogène par agglutination, mais dans les 3 cas, il s'agissait d'enfant dont la brièveté de leur séjour dans le service ne permit pas de refaire des coprocultures.

Quatre fois, l'Immuno-Fluorescence permet d'identifier la présence simultanée de 2 Escherichia Coli entéro-pathogènes différents dans la même selle.

= 3 fois, il s'agissait de selles dont l'agglutination était négative (cas déjà cités);

= 1 fois par culture et agglutination avait été identifié un Escherichia Coli 111 B_4 (lysotype Bretonneau). L'immuno-fluorescence mit en évidence un 111 B_4 plus un 125 B_{15} .

De plus,

1.- 14 fois, les résultats de l'Immuno-Fluorescence sont en désaccord avec le résultat de l'agglutination initiale, mais en accord avec les identifications faites ultérieurement au laboratoire des Entérobactéries de l'Institut Pasteur, soit sur les mêmes souches, soit à partir des selles.

. 5 fois, l'agglutination initiale avait été trouvée positive mais la présence d'Escherichia Coli entéropathogène dans les selles n'avait pas été confirmée par l'Institut Pasteur. Or, l'immuno-fluorescence était bien négative.

. 9 fois l'agglutination initiale était négative mais la culture secondaire des selles et l'identification par agglutination à l'Institut Pasteur était positive.

Or, l'Immuno-Fluorescence mettait en évidence les mêmes escherichia Coli entéro-pathogènes.

2.- A l'inverse, 4 fois les résultats obtenus par Immuno-Fluorescence sont en accord avec les résultats de l'agglutination initiale , mais en désaccord avec les identifications faites ultérieurement, à titre de vérification à l'Institut Pasteur.

Dans les 4 cas, il s'agit de résultats négatifs lors de l'agglutination de contrôle :

. 2 agglutinations négatives selles 27 et 42

. 2 agglutinations R selles 39 et 40.

et positifs par Immuno-Fluorescence. Mais les Escherichia Coli identifiés par Immuno-Fluorescence sont précisément ceux caractérisés par la première agglutination.

Enfin, sur 45 tentatives de culture secondaire des selles conservées en congélateur à -20° dans les conditions indiquées et qui avaient déjà permis la culture d'Escherichia Coli, pathogènes ou non, 6 seulement poussèrent en donnant des colonies d'Escherichia Coli, 39 res tèrent stériles ou, du moins, ne donnèrent plus de colonies d'Escherichia Coli.

INTERPRETATION ET DISCUSSION DE CES RESULTATS

L'étude de ces résultats globaux permet de comparer, dans les limites de ce travail, les deux méthodes d'agglutination et d'Immuno-Fluorescence en ce qui concerne leur spécificité et leur sensibilité réciproques.

Les conclusions seront ensuite confrontées avec celles des autres travaux publiés.

A.- SPÉCIFICITÉ

1.- Ces résultats permettent , dans tous les cas comparables, de confirmer une spécificité de la méthode d'identification par Immuno-Fluorescence au moins égale à la méthode d'agglutination. En effet :

- dans tous les cas (56) dont le résultat fut positif à la fois par agglutination et par Immuno-fluorescence, l'Immuno-fluorescence identifia le même sérotype d'Escherichia Coli entéro-pathogène que l'agglutination ;
- parmi ces cas, lors que l'Immuno-Fluorescence identifia, dans la même selle, 2 escherichia Coli entéro-pathogène différents, l'un des deux était celui identifié par agglutination.

2.- De plus, plusieurs résultats confirment la grande spécificité de l'identification par Immuno-fluorescence sans que l'on puisse la comparer, dans ces cas particuliers, à la méthode d'agglutination. En effet :

a.- On a vu que 5 fois la vérification effectuée à L'institut Pasteur (sur lesmêmes souches) n'avait pas confirmé la présence d'Escherichia Coli entéropathogène identifié initialement par agglutination sur lame. Or, dans ces 5 cas, l'Immuno-Fluorescence était restée négative.

Il est bien évident que le premier résultat faussement positif par agglutination ne doit pas être interprêté comme la conséquence d'un défaut de spécificité de cette méthode, mais vraisemblablement comme le produit d'une erreur de technique ou de transcription, corrigée lors du second examen. Mais l'Immuno-Fluorescence , en relevant cette erreur, a eu, dans ces circonstances, l'occasion de montrer ses qualités de spécificité.

b.- C'est une erreur d'agglutination du même ordre (fausse agglutination initiale positive) qui est reconnue par l'examen en Immuno-Fluorescence de la selle n° 35.

En effet, l'agglutination initiale avait identifié un Escherichia Coli entéro-pathogène O 111 B_4, mais la souche avait été trouvée non agglutinable à l'Institut Pasteur. L'identification dans la même selle par Immuno-fluorescence d'un Escherichia Coli O 125 B_{15} motiva une seconde culture, et celle-ci permit d'isoler effectivement un Escherichia Coli O 125 B_{15} dûment vérifié.

Il est vraisemblable que la flore de la selle étant polymorphe, la première culture avait isolé un Escherichia Coli non pathogène sur lequel avait porté l'erreur d'agglutination, la seconde culture ayant trouvé l'Escherichia Coli pathogène. C'est d'emblée et avec la plus grande facilité que l'Immuno-Fluorescence permit de relever cette double erreur initiale.

c.- Enfin, il resté à analyser les 16 résultats positifs seulement par Immuno-fluorescence.

Ils constituent,pris isolément, le principal argument de défiance envers la spécificité de la méthode d'Immuno-fluorescence. Mais l'étude des dossiers hospitaliers correspondants, en replaçant ces résultats, apparemment discordants, dans leur contexte clinique et thérapeutique, permet de très intéressantes remarques .
En effet :

. 9 fois sur 16 l'Escherichia Coli entéro-pathogène identifié a précisément le même sérotype que celui isolé dans les selles du même enfant par agglutination de coprocultures faites soit avant, soit après l'examen en cause. Il est difficile d'évoquer une simple coïncidence

. Dans les 7 cas restants , il n'est pas possible d'affirmer l'authenticité des bactéries identifiées par Immuno-Fluorescence. Il faut cependant tenir compte de ce que :

= 4 cas correspondent à des prélèvements d'enfants diarrhéiques traités depuis plusieurs jours par le sulfate de Colistine per os (doses supérieures ou égales à 200.000 u/kg).

= et 3 fois aucune culture ultérieure ne put être effectuée en raison du départ des enfants.

EN CONCLUSION :

Il semble que l'on puisse affirmer q u'aucun des 224 résultats ne permette de mettre en doute la spécificité de la méthode, puisque :

- dans les 205 cas de concordance (Immuno-Fluorescence positive, agglutination positive) l'Immuno-Fluorescence n'a jamais identifié un Escherichia Coli entéro-pathogène d'un sérotype différent de celui isolé par culture et agglutination ;

- parmi les 16 cas de discordance par excès de l'Immuno-fluorescence (immuno-fluorescence positive, agglutination négative) :

. 9 fois une agglutination précédente ou ultérieure concordante constitue une forte présomption en faveur du bien-fondé du résultat obtenu par Immuno-Fluorescence ;

. quant aux 7 cas restants, l'action de la Colistine (4 fois) ou l'absence de prélèvements ultérieurs (3 fois) ne permettent pas d'en tirer des conclusions défavorables.

B.- LA SENSIBILITÉ DE LA MÉTHODE D'IMMUNOFLUORESCENCE

Paraît supérieure à celle de la méthode d'agglutination.

La comparaison des résultats globaux le suggère :

- 59 résultats positifs par Agglutination
- 72 résultats positifs par Immuno-Fluorescence.

Leur analyse le confirme. En effet :

1.- Certes, 3 cas témoignent contre la sensibilité de l'Immuno-Fluorescence ; ce sont les 3 résultats, négatifs par Immuno-Fluorescence, positifs par Agglutination.

Mais, dans ces 3 cas, la fluorescence parasite liée à la fluorescence spontanée des débris végétaux de la selle était si importante qu'il n'était pas possible de distinguer la morphologie des bactéries.

Il est probable qu'elles étaient présentes, fluorescentes mais non distinguables, masquées par la fluorescence parasite non spécifique. Il s'agit d'un échec lié aux conditions d'examen sur étalement de selle, mais certainement pas à un défaut de sensibilité de la méthode d'Immuno-Fluorescence.

Dans les 3 cas, le prélèvement de selles avait été effectué en phase de diarrhée aiguë, alors que les 3 enfants recevaient une alimentation uniquement constituée par de la soupe de carottes, depuis au moins 24 h. Il est vraisemblable que c'est la forte fluorescence de ces débris végétaux surabondants qui a masqué la morphologie bactérienne.

2.- Par contre, plusieurs cas plaident en faveur d'une sensibilité de la méthode d'Immuno-Fluorescence supérieure à celle de la méthode d'agglutination.

a.- Evidemment, les 16 cas de résultats positifs par Immuno-Fluorescence, négatifs par agglutination. L'existence d'un traitement par Colistine per os étant, dans 8 cas, une explication vraisemblable de la négativité de la culture ;

b.- Mais aussi l'identification simultanée de 2 Coli entéro-pathogène :

. 1 fois dans une selle positive par agglutination (le sérotype isolé par agglutination étant l'un des deux identifié par Immuno-Fluorescence)

. 3 fois dans des selles dont l'agglutination était négative.

A ce propos, l'étude des résultats de l'examen de deux de ces selles est significative . Ces deux échantillons provenaient du même nourrisson chez lequel ils avaient été prélevés à 3 semaines d'intervalle. Les épreuves d'agglutination étaient, dans les 2 cas, négatives.

Dans le premier échantillon : l'Immuno-fluorescence révélait la présence simultanée de Escherichia Coli O 55 B_5 et Escherichia Coli O 125 B_{15} . Or, l'enfant recevait alors un traitement de sulfate de Colistine pour une gastro-entérite découverte depuis 3 jours et dont les coprocultures initiales avaient révélé qu'elle était due à un Escherichia Coli O 55 B_5 . Cette diarrhée guérit en quelques jours, mais une coproculture faite dix jours plus tard, révélait précisément l'existence d'un Escherichia Coli O 125 B_{15} .

L'immuno-Fluorescence avait donc identifié à la fois :

= l'Escherichia Coli O 55 B_5 découvert par agglutination 4 jours plus tôt et

= l'Escherichia Coli O 125 B15 mis en évidence par agglutination 10 jours plus tard.

Dans le second échantillon recueilli 3 semaines après le premier pour un examen systématique, alors que l'agglutination est négative, l'Immuno-Fluorescence décèle la présence :

= d'un Escherichia Coli O 55 B_5 ce qui n'est pas pour étonner ;

= mais aussi d'un Escherichia Coli 111 B_4.

Or, 6 semaines auparavant, l'enfant avait fait un premier épisode diarrhéique qui avait motivé un premier traitement antibiotique et les agglutinations faites à l'époque révélaient précisément la présence, dans les selles de Coli O 111 B_4.

On peut donc penser que l'enfant a fait successivement :

= un épisode diarrhéique à O 111 B_4 diagnostiqué par agglutination,

= un deuxième épisode diarrhéique à O 55 B_5 diagnostiqué par agglutination,

a été contaminé, enfin, par un Escherichia Coli O 125 B_{15} qui n'a pas provoqué de diarrhée, soit en raison d'une immunisation antérieure, soit grâce à la protection de la Colistine motivée par les deux épisodes diarrhéiques.

- Un premier examen par Immuno-Fluorescence a mis en évidence le O 55 B_5 responsable de la diarrhée récente, ainsi que le O 125 B_{15} ultérieurement retrouvé par agglutination.

- Le second exalen par Immuno-Fluorescence (3 semaines plus tard) a retrouvé les 2 Escherichia Coli ayant provoqué les deux épisodes diarrhéiques successifs : O 55 B_5 et O 111 B_4, dont le traitement a permis la guérison clinique, la stérilisation apparente par les méthodes d'agglutination, mais a laissé, en réalité, l'enfant porteur de germes que l'Immuno-Fluorescence a retrouvés.

Il faut préciser que, à la même époque, plusieurs cas de gastro-entérite dues à ces 3 escherichia Coli entéro-pathogènes sévissaient dans l'entourage hospitalier de ce nourrisson.

L'exemple de cet enfant nous paraît être un cas particulièrement évocateur de la sensibilité de la méthode d'Immuno-Fluorescence .

c.- Et, enfin, en faveur de la même conclusion, plaident les 9 cas déjà cités de rectification par Immuno-fluorescence de résultats d'agglutination faussement négatifs à un premier examen , trouvé positif par seconde culture motivée par le résultat de l'Immuno-Fluorescence, et parmi ces cas, celui de la selle 82 particulièrement démonstratif.

Initialement, une première culture donnait une agglutination négative , cette négativité était confirmée par l'examen de la même souche à l'Institut Pasteur.

L'étude de la selle par Immuno-Fluorescence ayant identifié un Escherichia Coli O 86 B_7, une seconde culture fut effectuée ; elle poussa mais l'agglutination fut encore négative. C'est une 3ème culture qui permit d'obtenir effectivement une agglutination positive :

- sur lame à 86 B_7 et 127 B_8 et
- sur tube à Escherichia Coli 86 B_7

Cette succession de cultures et d'agglutination exigeant chacune 24 h. au minimum, contraste avec la facilité et la simplicité avec lesquelles la méthode d'Immuno-Fluorescence permit d'obtenir le même résultat en moins d'une heure.

Il faut signaler, enfin, que la réaction croisée par la méthode d'agglutination entre 86 B_7 et 127 B_8 , bien connue et plusieurs fois retrouvée dans cette étude, n'est jamais constatée par Immuno-Fluorescence.

C.- La Comparaison de ces Résultats

avec ceux des travaux déjà cités et analysés, révèle une concordance remarquable.

Le tableau n° 7 résume ces résultats.

TABLEAU N° VII

Travaux cités	Nbre de cas Total	Corrélation %	Corrélation Nbre de cas	Discordance Excès de résultats + par Immun-Fluor. (I F + Agg.-)		Discordance Excès de résultats+par Agglut. (I F- Agg.+)
WHITAKER 1958 Réf. 42	128	69	89 53+ 36-	39	30%	0
NELSON & WHITAKER 1960 Réf. 29	365	98	358 35 + 323 -	2		5
COHEN, PAGE et STULBERG 1961 réf.7	87	87	76 41 + 35 -	6	6,9%	5
THOMASON et Coll. réf. 36	307 291	88	257 72 + 185 -	44 34	14,3% 11,6%	0
Travaux personnels	224	91	205 56 + 149 -	16	7,1%	3

1.- CORRELATION :

Bien que le nombre peu élevé d'examens autorise difficilement une comparaison en pourcentage, ce mode d'expression évocateur permet de constater la corrélation entre les deux méthodes d'agglutination et d'Immuno-Fluorescence dans 90 % des cas en moyenne, sauf dans le premier travail consacré à l'étude de la méthode d'Immuno-Fluorescence, dans lequel WHITAKER et Coll. (réf. 42) ne trouvent une corrélation que dans 69 % des cas.

2.- DISCORDANCES PAR EXCES DE RESULTATS POSITIFS PAR IMMUNO-FLUORESCENCE.

Dans tous les travaux, le défaut de corrélation provient , à quelques unités près, d'un excès de résultats positifs par Immuno-Fluorescence. L'explication qui est donnée par les auteurs de cette plus grande sensibilité de l'identification par Immuno-Fluorescence est double et nous y souscrivons :

a.- La première est l'erreur de culture possible, : celle-ci signalée par NELSON et WHITAKER (réf.29) qui rapportent 8 cas positifs par Immuno-Fluorescence mais dont la culture était initialement négative et ne fut trouvée positive que lors d'un second examen. De même THOMASON et Coll. (réf.36) citent 5 selles sur 40 qui, initialement négatives, ne furent trouvées positives que par seconde culture provoquée par un résultat positif par l'Immuno-Fluorescence.

Nous rappelons les 9 cas analogues déjà cités dont la fausse agglutination négative initiale fut rectifiée par la seconde culture qu'avait activé le résultat positif d'Immuno-Fluorescence.

Il est évident que la fréquence de ces erreurs de culture diminue considérablement lorsqu'une seconde cul - ture de contrôle peut être effectuée, mais cela n'a été possible que pour une partie seulement de ces travaux puisque, dans une proportion importante de cas, l'altération des selles pendant leur conservation ne permet pas d'effectuer une vérification valable.

b.- La seconde explication à cet excès de résultats positifs par Immuno-Fluorescence est déjà signalée par WHITAKER et Coll. (réf.42) dès 1958) : c'est la possibilité d'identification par Immuno-Fluorescence des bactéries stériles ou mortes.

WHITAKER expliquait ainsi que, dans 39 selles, les résultats ne soient positifs que par Immuno-Fluorescence et il fondait cette hypothèse sur le fait que tous les enfants correspondants étaient traités par des antibiotiques (Néomycine).

La vérification de cette hypothèse a été effectuée en 1960 par NELSON et WHITAKER (réf. 29).

- d'une part, les auteurs ont constaté que des cultures tuées par le formol étaient encore visibles par Immuno-Fluorescence ;
- d'autre part, ils ont étudié par culture et Immuno-fluorescence, les selles prélevées quotidiennement d'enfants atteints de gastro-entérite à Escherichia Coli entéro-pathogène et traités par Néomycine. Ils ont vérifié la discordance entre les résultats de culture et de l' Immuno-Fluorescence et montré que la Néomycine comme le formol modifiait la morphologie des bactéries sans les effacer.

  Ils décrivent, comme conséquences visibles en Immuno-Fluorescence, de l'action de ces substances :

  1.- diminution de taille des bactéries avec même quelques éléments coccoïdes,

  2.- disparition ou atténuation du halo brillant cerclant la bactérie ;

  3.- une altération de la morphologie consistant en distorsion et irrégularités ;

  4.- une répartition en agrégats.

Nous avons constaté plusieurs fois des modifications analogues (points 2 et 3) dans des selles d'enfants traités par le sulfate de Colistine et dont l'agglutination était négative.

Enfin, THOMASON et Coll. (réf. 36 et 5) pensent trouver une explication à cette discordance dans la multiplication rapide des Escherichia Coli sur l'écouvillon de prélèvement maintenu à la température de la chambre pendant 1 à 4 heures, alors que l'ensemencement du milieu de culture était effectué seulement 5 minutes après le prélèvement.

Mais ces circonstances particulières n'existent pas dans les autres travaux cités.

3.- DISCORDANCE PAR DEFAUT

Dans la comparaison des deux méthodes; en regard de l'importante discordance des résultats dus à la plus grande sensibilité de l'Immuno-Fluorescence, il faut relever les quelques cas de discordance dus à des résultats positifs par agglutination, négatifs par Immuno-Fluorescence, aucun n'est signalé par WHITAKER et Coll. (réf.42) ni par THOMASON et Coll; (réf. 36 et 5) . 5 cas sur 365 sont attribués par NELSON et WHITAKER (réf. 29) à la pauvreté des prélèvements sur écouvillons rectaux.

COHEN, PAGE et STULBERG (réf. 7) ne donnent pas d'explication à leurs 5 cas.

Quant à nos 3 cas, on a dit qu'on pouvait les attribuer très vraisemblablement à la confusion apportée par la fluorescence parasite non spécifique des débris végétaux.

Bien qu'elle n'ait pas été rapportée dans les travaux publiés dont nous avons eu connaissance, cette fluorescence parasite constitue, nous semble-t-il, la plus importante source de difficultés que la méthode d'Immuno-Fluorescence ait à surmonter dans le domaine de son application à l'identification directe dans les selles des Escherichia Coli entéropathogènes.

Corollaire de l'examen d'un produit biologique particulièrement riche en substances végétales, elle ne peut en être dissociée sans allonger la durée et compliquer les manipulations d'un examen dont la simplicité et la brièveté sont le principal intérêt.

Dans quelques cas, nous avons utilisé la centrifugation, qui permet la sédimentation et donc l'élimination d'une fraction des débris végétaux; cette méthode, intéressante puisque rapide, (quelques minutes de centrifugation d'une suspension de selles) ne nous a pas permis d'obtenir une diminution significative des débris fluorescents.

Cependant, une étude systématique des dilutions de selles, des temps et des vitesses de centrifugation optima n'a pas été effectuée.

Si les inconvénients de la fluorescence parasite sont confirmés au cours des travaux ultérieurs, cet artifice sera peut-être utile. Il faut souligner que cette discordance par défaut qui constitue le plus grave reproche que l'on puisse faire à la méthode d'Immuno-Fluorescence, puisqu'elle risque de conduire à méconnaître la présence d'Escherichia Coli entéro-pathogène dans les selles, peut être prévue et ses conséquences supprimées si toute selle richement fluorescente (ce qui est rare) est considérée comme suspecte.

C'est ainsi que nous avons procédé et c'est en appliquant ce principe que l'on peut affirmer qu'un résultat trouvé négatif par Immuno-Fluorescence est définitif.

4.- CONSERVATION DES SELLES :

L'altération des selles, que nous avons constatée, par la conservation en congélateur à -20° cent. (6 selles seulement sur 45 permirent de retrouver des colonies d'Eschérichia Coli par culture) ne fait que confirmer les constatations des autres auteurs :

En effet :

- WHITAKER et Coll. (réf. 42) en 1958 n'obtiennent plus que 24 cultures positives de Eschérichia Coli 127 B_8 sur 53 initialement positives après un séjour de 3 ans en congélateur.

- COHEN, PAGE et STULBERG (réf. 7) au terme d'une conservation de durée non précisée, ne trouvent plus que 16 cultures positives sur 35.

- THOMASON et Coll. (réf. 36) n'obtiennent plus que 183 cultures sur 227 positives avant le stockage.

C'est la méconnaissance de cette altération des selles par la congélation qui nous a conduit à utiliser ce procédé de conservation. Depuis, sur un petit nombre d'échantillons (12 selles) nous avons pu constater que le stockage à 4° cent. paraissait provoquer également une altération rapide des Escherichia Coli, puisqu'en moins de un mois, plus de la moitié des selles (7 sur 12), dont la culture avait été positive initialement, étaient devenues stériles de Escherichia Coli. Il semble que le meilleur procédé de conservation soit celui utilisé par THOMASON et Coll. à la température du laboratoire (réf. 37).

Ces auteurs ont constaté que, conservées pendant 4 semaines, à la température du laboratoire, des selles récoltées sur écouvillons imbibés de solution tampon donnaient à la culture (comme à l'examen par Immuno-Fluorescence) des résultats presque aussi bons que le matériel frais. Mais la proportion de culture secondairement négative augmente dès que la conservation est plus longue.

5.- MODE DE PRELEVEMENT DES SELLES :

Tous nos échantillons ont été prélevés sur des selles émises spontanément.

Mais la plupart des travaux américains , en particulier de THOMASON et Coll., portent sur des échantillons prélevés par écouvillons rectaux. L'intérêt de ce mode de prélèvement est évident puisqu'il supprime le délai d'émission de la selle et permet un examen immédiat.

Son seul inconvénient paraît être la difficulté de stockage, l'altération des selles portées par l'écouvillon étant rapide.

Les meilleures conditions matérielles nécessaires pour éviter cette altération en cours de stockage des écouvillons ont été systématiquement étudiées par THOMASON (réf.37) Elles n'ont pas d'intérêt pour une utilisation immédiate.

6.- CONSERVATION DES SERUMS CONJUGUES.

Six mois après leur préparation les sérums conjugués simples et mixtes, purs et dilués, qui tous étaient conservés en congélateur à -20°, avaient une activité analogue à celle observée juste après leur préparation.

Mais la répartition de ces sérums conjugués en fractions de petits volumes avait permis, au cours de l'utilisation quotidienne, de limiter le nombre des décongélations à une vingtaine de fois au maximum pour chaque échantillon.

NAIRN et Coll. (réf. 28) signalent en effet que la répétition de la décongélation suivie de recongélation peut provoquer , soit une perte du titre du conjugué, soit une instabilité de la combinaison entre l'anticorps et le fluorochrome, ou même les deux, mais ils ne précisent pas le nombre de décongélations tolérable. Pour la conservation prolongée des conjugués, les mêmes auteurs pensent que la lyophilisation serait une méthode satisfaisante, bien qu'ils n'aient pas noté de diminution d'activité de leurs sérums conjugués conservés à -20° pendant plusieurs années.

METHODE INDIRECTE

Avant de donner les conclusions que ces résultats nous semblent justifier, nous rapportons une courte expérimentation que nous avons effectuée pour vérifier la possibilité d'utilisation dans un but diagnostique de la méthode indirecte.

Celle-ci, on l'a vu, a pour principe la mise en évidence du complexe antigène-anticorps (ici Escherichia Coli entéro-pathogène et son anticorps spécifique) par fixation d'une antiglobuline marquée (fluorescente) homologue de l'espèce animale à laquelle appartient l'anticorps spécifique utilisé.

Son très grand avantage est de supprimer la nécessité de disposer des 9 ou 10 sérums spécifiques d'Escherichia Coli entéro-pathogènes fluorescents, la possession de sérum marqué antiglobuline de lapin étant suffisante (puisque les sérums spécifiques d'Escherichia Coli entéro-pathogènes habituellement utilisés et commercialisés sont des sérums de lapin).

Matériel utilisé :

- selles déjà utilisées en méthode directe ;
- sérums de lapin anti-Escherichia Coli entéro-pathogènes standard utilisés dans la méthode d'agglutination préparés par l'Institut Pasteur ;
- sérum de chèvre antiglobuline de lapin fluorescent dilué au 1/40

METHODE DE PREPARATION DES LAMES

La préparation des étalements de selles ne diffère pas de celle utilisée dans la méthode directe (cf. p. 32).

Le "Marquage", par contre, comprend un temps supplémentaire :

1.- Sur chaque étalement de selles, sont disposées 2 à 3 gouttes de sérum de lapin anti Eschérichia Coli du mélange de sérotypes ou du sérotype étudié.

2.- Après 20 minutes de contact, on lave avec du sérum physiologique tamponné froid, par écoulement doux et bain pendant 10 minutes, dans un bac rempli. Puis, la lame est séchée par évaporation spontanée.

3.- Quelques gouttes de sérum de chèvre fluorescent antiglobuline de lapin (dilué au 1/40) sont déposées sur la préparation et laissées en contact 20 minutes.

4.- Après nouveau lavage et bain dans les mêmes conditions.

5.- La lame épongée est recouverte d'une lamelle sous une goutte de glycérine temponnée et examinée.

Le temps de préparation exigé par cette méthode est donc de 30 minutes environ de plus que celui nécessaire à la méthode directe (45 minutes).

La lecture des lames est identique à celle effectuée en méthode directe.

Le principal inconvénient théorique de cette méthode indirecte étant le risque d'erreurs par excès dus à la présence possible dans le sérum globuline de chèvre antilapin (fluorescent) d'anticorps naturels correspondant à certains Escherichia Coli.

Ce sérum de chèvre marqué fut mis en présence de 20 selles ne contenant pas d'Escherichia Coli entéro-pathogène (négatives par culture et par Immuno-Fluorescence, méthode directe). Aucune fluorescence bactérienne ne fut trouvée.

Il fut ensuite examiné 2 échantillons de selles trouvées positives par culture et par Immuno-Fluorescence, méthode directe :

- D'une part :

  les mêmes sérotypes 119 B_{14} et 111 B_4 furent identifiés, la fluorescence étant à peine moins importante qu'elle ne l'était avec les mêmes selles en méthode directe ;

- D'autre part :

  les lames témoins préparées par contact avec le seul sérum fluorescent de chèvre (sans contact préalable avec sérum spécifique des Escherichia Coli homologues) ne montrèrent aucune fluorescence.

Ces résultats sont très encourageants puisque :

- aucune fausse réaction positive ne fut mise en évidence (pas de défaut de spécificité) ;
- les réactions positives attendues furent trouvées avec une intensité comparable à celle obtenue en méthode directe (bonne sensibilité).

Mais l'étude systématique de cette méthode utilisée dans un but diagnostique reste à entreprendre.

Nous avons également essayé de vérifier la possibilité théorique de mettre en évidence par la méthode indirecte la présence d'anticorps spécifiques d'Escherichia Coli entéropathogènes dans le sérum humain.

Avec un sérum dilué au 1/20 d'un enfant atteint, 15 jours auparavant, d'une gastro-entérite infantile à O 111 B_4, une fluorescence encore nette des colibacilles homologues a été constatée. Il semble que cette méthode de séro-diagnostic par Immuno-Fluorescence doive être systématiquement étudiée.

CONCLUSIONS

Il convient, tout d'abord, de souligner l'étroite concordance des résultats des travaux publiés jusqu'à ce jour et de nos études, ce qui renforce singulièrement les conclusions qui peuvent être formulées.

Le progrès le plus évident apporté par l'Immuno-Fluorescence dans la recherche des Escherichia Coli entéro-pathogènes dans les selles est aussi le plus précieux pour le clinicien. Il s'agit de la rapidité de la réponse.

Moins d'une heure après l'arrivée de l'enfant suspect, l'examen par Immuno-Fluorescence d'un étalement de selles émises spontanément ou prélevées par écouvillonnage rectal, permet :

- soit d'éliminer de façon formelle l'existence d'escherichia Coli entéro-pathogène,
- soit d'en affirmer la présence de façon extrêmement probable, que contrôlera l'agglutination après culture.

Le second avantage dela méthode d'identification des Escherichia Coli entéro-pathogènes par Immuno-Fluorescence est sa très grande sensibilité.

Elle permet de discerner facilement de rares bactéries pathogènes disséminées dans une abondante population de saprophytes.

Dans les mêmes conditions, par agglutination, il faudrait examiner un très grand nombre de colonies pour avoir une chance de trouver ces éléments pathogènes.

Il devient ainsi possible de reconnaître et d'isoler des porteurs de germes chez lesquels la proportion d'éléments pathogènes est extrêmement faible par rapport à la totalité de la flore intestinale, mais qui sont néanmoins en

puissance des agents contaminateurs.

Enfin, la mise en évidence d'Escherichia Coli entéro-pathogène tués ou rendus stériles par l'action des antibiotiques, donc non cultivables, est également possible, permettant, en cours de traitement, de s'assurer de la disparition complète des germes pathogènes et de cesser l'isolement de l'enfant.

En regard de ces précieux avantages, aucun reproche majeur ne peut être fait à l'Immuno-Fluorescence.

Mettant en jeu les mêmes antigènes et les mêmes anticorps que la méthode d'agglutination, on peut en attendre la même spécificité. Mais étant donné sa grande sensibilité, il faut, par contre, craindre les erreurs par excès qui ne sont, d'ailleurs, pas formellement démontrées et que seuls des contrôles systématiques par agglutination portant sur de grandes séries pourront confirmer.

Mais, dès maintenant, l'Immuno-Fluorescence peut être utilisée en toute quiétude comme une excellente méthode d'orientation qui donne, de façon quasi extemporanée, un résultat définitif, s'il est négatif, très probable mais à confirmer par culture, s'il est positif.

De grandes perspectives paraissent réservées à cette méthode et les obstacles matériels auxquels se heurte sa diffusion ne sauraient subsister longtemps. En effet :

- La source de lumière ultra-violette et les filtres adaptables à la plupart des modèles de microscopes, sont un très modeste équipement dont l'acquisition sera favorisée par les multiples et précieuses applications de l'Immuno-Fluorescence dans le domaine du diagnostic bactériologique et immunologique ;

- Quant aux sérums fluorescents , en attendant la diffusion des sérums d'Escherichia coli entéro-pathogènes spécifiques marqués, la possibilité de se procurer, en France, dès maintenant, du sérum fluorescent de chèvre

anti-globuline de lapin rend possible l'utilisation de la méthode indirecte. Celle-ci doit permettre désormais l'introduction dans la pratique courante de l'Immuno-Fluorescence comme méthode de diagnostic des gastro-entérites infantiles à colibacilles entéro-pathogènes.

VU et PERMIS d'IMPRIMER :

Le RECTEUR de l'ACADEMIE de PARIS :

J. R O C H E

Le DOYEN de la FACULTE de MEDECINE de PARIS,

L. B I N E T

Le PRESIDENT de la THESE :

JULIEN MARIE

BIBLIOGRAPHIE

1.- BEUTNER Ernst. H. 1961
Immunofluorescent staining. The fluorescent antibody method.
Bacteriological reviews 25 49/76.

2.- BOREK F. & SILVERSTEIN AM 1960
A new fluorescent label for antibody proteins
Arch. Biochem. 87, 293-297.

3.- CARTER Ch. & LEISE J.M. 1958
Specific staining of various bacteria with a single fluorescent antiglobulin.
J. Bacteriol. 76. 152-154.

4.- CHADWICK C.W., Mc ENTEGART M.G. & NAIRN R.C. 1958
Fluorescent protein tracers. A trial of new fluorochromes and the developement of an alternative to fluorescein.
Immunology 1, 315/327.

5.- CHERRY W.B., THOMASON B.M., POMALES-LEBRONA & EWING W.H.
Rapid presumptive identification of enteropathogenic Escherichia Coli in feacal smears by means of fluorescent antibody. Field evaluation
Bull. de l'O.M.S. 25, 159-172.

6.- COCHRANE C.G. 1960
La technique des anticorps fluorescents, applications à la microbiologie et au phénomène d'Arthus
Ann. de l'Institut Pasteur, 99, 329-349.

7.- COHEN F., PAGE R.H., STULBERG C.S. 1961.
Identification of Enteropathogenic Escherichia Coli
Amer. J. Dis. Child. 102, 82-91.

8.- COONS, HUGH , CREECH, JONES 1941.
Immunological properties of an antibody containing a fluorescent group
Biol. and Med. 47, 200-202

9.- COONS A.H., CREECH H.J., JONES R.N. & BERLINER E. 1942.
The demonstration of pneumococcal antigens i, tissues by the use of fluorescent antibody
J. Immunol. 45, 157-170.

10.- COONS A.H. 1958.
Fluorescent antibody methods in "General Cytochemical methods" (J.P. DANIELLI Ed.)
Vol. 1 p. 399 (Academic Press, New-York 1958).

11.- COONS A.H. 1959.
The diagnostic application of fluorescent antibodies
Schweiz Z. Path. Bakt. 22, 693/699.

12.- CREECH H.J. & JONES R.N. 1940.
The conjugation of horse serum albumin with 1,2 benzanthryl isocyanates.
J. Amer. Chem. Soc. 62, 1970/1975.

13.- CREECH & JONES 1941.
The conjugation of serum albumin with isocyanates of certain polynuclear aromatic hydrocarburs
J. Amer. Chem. Soc. 63, 1661/1669.

14.- CREECH & JONES 1941.
Conjugates synthezied from various proteins and the isocyanates of certain aromatic polynuclear hydrocarbons.
J. Amer. Chem. Soc. 63, 1670/1673.

15.- EAGLE H., SMITH D. & WICKERS P. 1936.
The effect of combination with diazocompounds on the immunological reactivy of antibodies.
J. Exp. Med. 63, 617/643.

16.- EDWARDS P.R. EWING W.H. 1955.
Identification of enterobacteriacoe
Minneapolis, Minn. Burgess Publishing C° p.141

17.- EMMART E.W. 1958
Observations on the absorption spectra of fluorescein, fluorescein derivatives and conjugates.
Arch. Biochem. Biophys. 73, 1,8.

18.-EWING W.H., TATUM H.W., DAVIS B.R., REAWIS R.W., 1956.
Studies on the serology of the E. Coli Group
U.S. Department of Health, Education and Welfare
Public Health service, communicable disease Center
Atlanta

19.-GOLDMAN M. 1957
Staining Toxoplasma gondii with fluorescein-labelled antibody II. A new serologic test for antibodies to toxoplasma based upon inhibition of specific staining.
J. Exptl. Med. 105, 557/573.

20.-GOLDWASSER R.A. & SHEPARD C.C. 1958
Staining of complement and modifications of fluorescent antibody procedures
J. Immuno. 80, 122/131.

21.-HOPKINS S.J. & WORMALL A. 1933.
Phenyl isocyanate protein compounds and their immunological reactions.
Biochem. J. 27, 740/753.

22.-KAMPELMACHER E.H.
Antonie v. Leeuwenhoek 25, 289.

23.-KEUDRICH P.L. and al. 1961.
Fluorescent antibody technique
Amer. J. Dis. Child 101, 149-155.

24.-KLEIN P. & BURKHOLDER P. 1959.
Die darstellung von fixiertem Complement mit markiertem Antikomplement.
Schweiz. Z. Pathol. U Bakteriol. 22, 729/731.

25.-LANDSTEINER K. 1945.
The specificity of serological reactions
2nd Cd Cambridge Harward University Press.

26.-MARRACK J. 1934
Nature of antibodies
Nature 133, 292:293.

27.- MARSHALL J.D., EVELAND W.C. and SMITH C.W, 1958.
Superiority of fluorescein isothicyanate (Riggs) for fluorescent antibody technic with a modification of its application .
Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 98, 898/900.

28.- NAIRN R.C. 1962.
Fluorescent Protein tracing
Livingstone L T D Edimburgh and London.

29.- NELSON J.D., WHITAKER J.A. 1960.
Diagnosis of enteropathogenic Escherichia Coli Diarrhea by fluorescein labeled antibodies.
J. Pediatr. 57, 684-688.

30.- REINER L. 1930.
On the chemical alteration of purified antibody proteins
Science 72, 483/484.

31.- RIGGS J.L., SEIWALD R.J., BURCKALTER J.H., DOWNS C.M. and METCALF T.G. 1958.
Isothiocyanate compounds as fluorescent labeling agentŝ for immuno serum
A.M. J. Pathol. 34, 338/347.

32.- STULBERG C.S.
Immuno-fluorescence as a diagnostic tool
Amer. J. Dis. Child. 101, 137-140.

33.- STULBERG, ZUELZER, NOLKE, THOMPSON 1955.
Escherichia Coli O 127 B_8 a pathogenic Strain causing infantile diarrhea Epidemiologie et Bacteriology of a prolonged Outbreak in a premature nursery
A.M.A.J. Disease of children, 90, 125.

34.- THOMASON B.M., CHERRY W.B., EWING W.H. 1959.
Rapid identification of serotypes of Escherichia Coli with polyvalent antibody globulins labelled with Fluorescein
Bact. Proc. 90, 1959.

35.- THOMASON B.M., CHERRY W.F., EDWARDS P.R. 1959
Staining Bacterial smears with fluorescent antibody . Identification of salmonella in fecal specimens.
J. Bacteriol. 77, 478-486.

36.- THOMASON B.M., CHERRY W.B. DAVIS B.R. & A. POMALES-LEBRON 1961.
Rapid presumptive identification of enteropathogenic escherichia Coli in faecalsmears by means of fluorescent antibody . Preparation and testing of reagents.
Bull. de l'Organis. Mondiale de la Santé; 25, 137-152.

37.- THOMASON B.M., CHERRY W.B., and POMALES-LEBRON A. 1961.
Use of various types of swabs for collection and preservation of feacal specimens
Bull. de l'O.M.S. 25, 153-158.

38.- UEHLEKE H. 1958
Neue Moglichkeiten zur Herstellung fluoresczenzmarkier ; Protein.
Z. Naturforsch 13 B 722/724.

39.- VARELA G., AGUIRRE A. and CARRELLOS (1946 .
BOL Med. Hosp. Infant (Mex.) 3, 3

40.- WEBER G. 1952
Polarization of the fluorescence of macromolecules II. Fluorescent conjugates of ovalbumin and bovine serum albumin.
Biochem. J. 51, 155/167.

41.- WELLER Th., COONS A.H. 1954.
Fluorescent antibody studies with agent of varicella and Herpes zoster propagated in vitro
Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 86, 789/794.

42.- WHITAKER, PAGE, STULBERG, ZUELZER 1958.
Rapid identification of Enteropathogenic Escherichia Coli O 127 B_8 by the fluorescent antibody technique
A.M.A.J. Disease of children 95, 1-8.

43.- WOLOCHOW H. 1958,
Fluorescent labels for antibody proteins
Application to bacterial identification.
J. Bact. 77, 164-166.

Une bibliographie plus complète sera trouvée dans :

- L'article de COONS de 1959 :

The Diagnostic application of Fluorescent antibodies (réf. 11).

- L'article de DEUTNER de 1961.

Immunofluorescent staining (réf.1)

- ainsi que dans le livre de NAIRN : Fluorescent Protein Tracing de 1962 (réf. 28).

Cet ouvrage et les deux autres articles font le point des applications de l'Immuno-Fluorescence dans les domaines histologiques et bactériologiques.

Dans le cadre restreint des applications de l'Immuno-Fluorescence à l'identification dans les selles des Escherichia Coli entéro-pathogènes, l'article le plus riche est celui de : THOMASON et Collaborateurs publié en 1961, dans le Bulletin de l'Organisation Mondiale de la Santé, Volume 25, n° 2, (réf. 5, 36, 37).